

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



**Tese**

**Avaliações de creme cicatrizante com extratos vegetais de urucum e trigo  
associado à imunomodulação junto ao tratamento convencional da  
esporotricose**

**Martha Bravo Cruz Piñeiro**

Pelotas, 2024

**Martha Bravo Cruz Piñeiro**

**Avaliações de creme cicatrizante com extratos vegetais de urucum e trigo  
associado à imunomodulação junto ao tratamento convencional da  
esporotricose**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Márcia de Oliveira Nobre  
Coorientador: Dr<sup>a</sup>. Sabrina de Oliveira Capella

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação da Publicação

P649a Piñeiro, Martha Bravo Cruz

Avaliações de cremes cicatrizantes com extratos vegetais de urucum e trigo associado à imunomodulação junto ao tratamento convencional da esporotricose [recurso eletrônico] / Martha Bravo Cruz Piñeiro ; Márcia de Oliveira Nobre, orientadora ; Sabrina de Oliveira Capella, coorientadora. — Pelotas, 2024.  
104 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Gatos. 2. Ratos wistar. 3. *Sporothrix* spp. 4. Timomodulina. 5. Zoonose. I. Nobre, Márcia de Oliveira, orient. II. Capella, Sabrina de Oliveira, coorient. III. Título.

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Martha Bravo Cruz Piñeiro

Avaliações de creme cicatrizante com extratos vegetais de urucum e trigo associado à imunomodulação junto ao tratamento convencional da esporotricose

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/02/2024

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Oliveira Nobre (Orientadora)  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Gevehr Fernandes  
Doutor em Patologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Melissa Orzechowski Xavier  
Doutor em Ciências Pneumológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Sérgio Jorge  
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

## **Agradecimentos**

À minha família, meu alicerce e razão de tudo isso, por sempre me apoiarem incondicionalmente.

Ao meu noivo Leonardo David de Azevedo, agradeço por não ter soltado minha mão desde o período de mestrado, por compreender minhas ausências e por ser um suporte em todas minhas decisões. Sua presença tornou cada desafio mais fácil de enfrentar.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado em todo os momentos, agradeço por confiarem em mim e por compartilharem cada momento dessa jornada.

Aos colaboradores do ClinPet, pelas amizades que construí.

A minha colega, amiga e coorientadora Sabrina de Oliveira Capella, minha gratidão por sua importância crucial nessa etapa. Sua confiança, disponibilidade e apoio foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Dra. Márcia de Oliveira Nobre, expresso minha profunda gratidão. Desde a graduação até agora, sua crença em meu potencial e apoio constante foram fundamentais. Você é um exemplo de profissionalismo e dedicação.

Às parcerias que foram essenciais para execução desse trabalho: Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande (FaMed-FURG), Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária (MicVet) e Serviço de Oncologia Veterinária (SOVET) por cederem seu espaço, tempo, pela paciência e pelo aprendizado.

À Prefeitura Municipal de Pelotas, especialmente Isabel Martins Madrid do setor de Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e Cristiane Bercot, por acreditarem no meu trabalho. Fico honrado por ter tido a oportunidade de fazer parte do Gatil Municipal de

Pelotas, integrando-me a essa valiosa família da qual tenho muito orgulho de ter feito parte.

Ao Hospital Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, principalmente, aos residentes que colaboraram no projeto, meus sinceros agradecimentos pela valiosa contribuição.

À Universidade Federal de Pelotas, por oportunizar a realização do curso de Medicina Veterinária e minha Pós-Graduação.

Aos gatos, que foram a razão pela qual esse estudo foi planejado, desempenharam um papel essencial como participantes, além de proporcionarem não apenas alegrias, mas também impulsionarem o estudo ao demonstrarem melhorias em seus tratamentos.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo- Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS (FAPERGS) pelo apoio financeiro.

Aos meus alunos, que todos os dias me lembram da importância e realização da minha profissão. Mesmo diante das dificuldades, nunca desisti, pois, ao ministrar uma aula relembro o propósito que orienta minha trajetória.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho, o meu muito obrigado.

## Resumo

PIÑEIRO, Martha Bravo Cruz. 2024. 104f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

A esporotricose é a micose de implantação subcutânea mais importante do Brasil, causada por fungos do Complexo *Sporothrix schenckii*, e que frequentemente acomete humanos, cães e, principalmente, gatos. A esporotricose felina e a transmissão zoonótica vêm crescendo no Brasil, e casos de falhas do tratamento convencional já foram relatados. Neste trabalho objetivou-se avaliar a eficácia de fórmulas contendo ativos de extratos vegetais de *Bixa Orellana* L. (urucum) e *Triticum aestivum* (trigo), assim como da timomodulina como adjuvantes no tratamento de lesões cutâneas de esporotricose, em experimentos *in vitro* e *in vivo* em modelo murino e em gatos. Inicialmente obteve-se os extratos oleosos de urucum, aquoso e etanólico de trigo. Na sequência confeccionou-se duas fórmulas farmacêuticas distintas, a primeira contendo os extratos oleoso de urucum e aquoso de trigo (LCF2001) e a segunda com os extratos oleoso de urucum e etanólico de trigo (LCFT2002). No estudo *in vitro* as formulações foram avaliadas frente a isolados *Sporothrix* em relação a suscetibilidade antifúngica e teste de sinergismo, o extrato etanólico de trigo e o extrato oleoso de urucum apresentaram ação antifúngica isolado, no entanto, em sinergismo apresentaram efeito antagônico. No estudo *in vivo* em modelo murino para avaliação da timomodulina, LCF2001 e LCFT2002 foi induzido experimentalmente esporotricose em ratos *wistar* e estes tratados diariamente com: formulação tópica LCFT2001 (GF1); formulação tópica (GF2); timomodulina, itraconazol e formulação LCFT2001 (GITF1); timomodulina, itraconazol e formulação LCFT2002 (GITF2); timomodulina e itraconazol (GIT); timomodulina (GT); controle positivo, itraconazol (GI); controle negativo, sem tratamento (GCN). Aos quatro, 11, 18, 30 e 42 dias, avaliou-se a efetividade dos tratamentos por dados clínicos, avaliação micológica (quantificação de carga fúngica e retroisolamento) e histológica (padrão de lesão tecidual). Foi possível observar que os grupos GF2, GITF1 e GITF2 diferenciou-se clinicamente dos outros grupos demonstrando maiores valores de sinais inflamatórios no início do período experimental e decrescendo com o tempo de tratamento. Os grupos GIT, GITF1 e GITF2 reduziram a carga fúngica, diferenciando positivamente dos grupos controles. Esses grupos na histologia demonstram maior quantidade de linfócitos e menor quantidade de células fúngicas, ademais, o GITF2 apresentando fibrose madura antes os demais grupos. No ensaio clínico em felinos para avaliação da timomodulina e LCFT2002 foram estudados gatos com esporotricose naturalmente. Para isso foi realizada um estudo prospectivo analisando o tratamento com itraconazol, timomodulina e formulação tópica LCFT2002 (GITF); itraconazol e timomodulina (GIT); itraconazol e formulação tópica LCFT2002 (GIF); e itraconazol (GI) por 60 dias. Os felinos foram submetidos a avaliação clínica, citológica (quantificação de leveduras nas lesões) e histológica (padrão de lesão tecidual).

Constatou-se que o grupo GIT apresentou melhor desfecho clínico, não apresentando nenhuma falha terapêutica, no entanto, o grupo GITF apresentou uma redução da quantidade de células fúngicas e área das lesões em menor tempo. Além disso, na histologia observou que o grupo GITF apresentou maior quantidade de linfócitos, células epitelioides e fibrose com o tratamento. Destacando que o tratamento com timomodulina e formulação tópica LCFT2002 como adjuvantes aumenta resposta inflamatória, potencializando o tratamento com itraconazol. A tese resultou em três artigos, para os periódicos Revista Observatório de La Economia Latinoamericana, *Mycoses* e *Ciência Animal*.

**Palavras-chave:** gatos, ratos *wistar*; *Sporothrix spp*; timomodulina; zoonose.

## Abstract

PIÑEIRO, Martha Bravo Cruz. **Evaluation of a healing cream containing annatto and wheat plant extracts associated with immunomodulation in combination with conventional treatment for sporotrichosis.** 2024. 104f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Sporotrichosis is the most important subcutaneous implantation mycosis in Brazil, caused by fungi of the *Sporothrix schenckii* complex, frequently affecting humans, dogs, and especially cats. Feline sporotrichosis and its zoonotic transmission have been increasing in Brazil, and cases of treatment failure with conventional therapies have already been reported. This study aimed to evaluate the efficacy of formulations containing plant-derived actives from *Bixa orellana* L. (annatto) and *Triticum aestivum* (wheat), as well as thymomodulin as adjuvants in the treatment of cutaneous sporotrichosis lesions, through in vitro and in vivo experiments in murine models and naturally infected cats. Initially, oleaginous extracts of annatto and aqueous and ethanolic extracts of wheat were obtained. Subsequently, two distinct pharmaceutical formulations were developed: one containing annatto oil and aqueous wheat extract (LCFT2001), and another containing annatto oil and ethanolic wheat extract (LCFT2002). In the in vitro study, the formulations were tested against *Sporothrix* isolates to assess antifungal susceptibility and synergism. The ethanolic wheat extract and annatto oil showed individual antifungal activity; however, when combined, they exhibited antagonistic effects. In the in vivo murine model, sporotrichosis was experimentally induced in Wistar rats, which were treated daily with: topical formulation LCFT2001 (GF1); topical formulation LCFT2002 (GF2); thymomodulin, itraconazole, and LCFT2001 (GITF1); thymomodulin, itraconazole, and LCFT2002 (GITF2); thymomodulin and itraconazole (GIT); thymomodulin alone (GT); positive control with itraconazole (GI); and a negative control without treatment (GCN). At days 4, 11, 18, 30, and 42, treatment effectiveness was evaluated through clinical data, mycological analysis (fungal load quantification and re-isolation), and histological assessment (tissue lesion pattern). It was observed that groups GF2, GITF1, and GITF2 showed distinct clinical progression, with more pronounced inflammatory signs early on, which decreased over the course of treatment. The GIT, GITF1, and GITF2 groups significantly reduced fungal load compared to controls. Histologically, these groups exhibited greater lymphocytic infiltration and fewer fungal cells; in addition, GITF2 showed mature fibrosis earlier than other groups. In the clinical trial in cats, the effects of thymomodulin and LCFT2002 were evaluated in cats with naturally acquired

sporotrichosis. This was a prospective study analyzing treatments with itraconazole, thymomodulin, and LCFT2002 topical formulation (GITF); itraconazole and thymomodulin (GIT); itraconazole and LCFT2002 (GIF); and itraconazole alone (GI) over a 60-day period. Cats underwent clinical, cytological (yeast quantification in lesions), and histological evaluations (tissue lesion pattern). It was found that the GIT group had the best clinical outcome, with no therapeutic failures, while the GITF group showed faster reduction in fungal cells and lesion areas. Histologically, the GITF group showed increased numbers of lymphocytes, epithelioid cells, and fibrosis during treatment. These findings highlight that the use of thymomodulin and topical LCFT2002 as adjuvants enhances the inflammatory response, potentiating the effects of itraconazole. This thesis resulted in three scientific articles submitted to the journals *Revista Observatório de La Economía Latinoamericana*, *Mycoses*, and *Ciência Animal*.

**Keywords:** cats; Wistar rats; *Sporothrix spp.*; thymomodulin; zoonosis

## **Lista de Figuras**

- Figura 1 Os valores dos somatórios demonstrados pelo uso de formulação tópica LCFT2001 (GF1); LCFT2002 (GF2); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2001 (GITF1); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2002 (GITF2); da associação de timomodulina e itraconazol (GIT); timomodulina (GT); itraconazol (GI) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GCN) nos períodos de avaliações de quatro, 11, 18, 30 e 42 dias..... 44
- Figura 2 Resultados dos valores de leucócitos totais (células/ $\mu$ L) do sangue periférico dos animais, demonstrados pelo uso de formulação tópica LCFT2001 (GF1); LCFT2002 (GF2); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2001 (GITF1); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2002 (GITF2); da associação de timomodulina e itraconazol (GIT); timomodulina (GT); itraconazol (GI) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GCN) nos períodos de avaliações de quatro, 11, 18, 30 e 42 dias..... 45
- Figura 1 Demonstração da mediana de escores de quantidade de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células epitelioides, fibrose e células fúngicas, indicando ausente (0), escasso (1), moderado (2) e exacerbado (3) de feridas dos gatos com esporotricose tratados com itraconazol, timomodulina e formulação tópica (GITF); itraconazol e timomodulina (GIT); itraconazol e formulação tópica (GIF) e itraconazol (GI)..... 77

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de extratos oleoso de urucum ( <i>B. orellana</i> L.), aquoso e etanólico de trigo ( <i>T. aestivum</i> ) contra <i>Sporothrix schenckii</i> complexo obtido de humanos e animais.....	28
Tabela 2	Concentração inibitória mínima (CIM) e índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) do extrato de urucum, extrato etanólico de trigo (mg/mL) e itraconazol (µg/mL) em combinações contra <i>Sporothrix brasiliensis</i> sensíveis e resistentes ao itraconazol.....	29
Tabela 1	Resultados dos valores de UFC/g de <i>Sporothrix brasiliensis</i> no ponto de inoculação, demonstrados pelo uso de formulação tópica LCFT2001 (GF1); LCFT2002 (GF2); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2001 (GITF1); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2002 (GITF2); da associação de timomodulina e itraconazol (GIT); timomodulina (GT); itraconazol (GCP) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GCN) nos períodos de avaliações de quatro, 11, 18, 30 e 42 dias.....	47
Tabela 1	Demonstração dos grupos de felinos com esporotricose distribuídos nos grupos experimentais tratados com itraconazol, timomodulina e formulação tópica (GITF), itraconazol e timomodulina (GIT), itraconazol e formulação tópica (GIF) e somente itraconazol (GI).....	73

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

CAPES	Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
FaMed-Furg	Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande
FAPERGS	Fundaçao de Amparo à pesquisa do Estado do RS
FeLV	Leucemia viral felina
FIV	Vírus da imunodeficiênci a felina
GCN	Controle negativo
GI	Tratamento com itraconazol
GIT	Tratamento com itraconazol e timomodulina
GITF	Tratamento com itraconazol, timomodulina e formulação tópica
GITF1	Tratamento com itraconazol, timomodulina e formulação LCFT2001
GITF2	Tratamento com itraconazol, timomodulina e formulação LCFT2002
GT	Tratamento com timomodulina
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
ITZ	Itraconazol
PCR	Receptores de reconhecimento de patógenos
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
UV	Ultravioleta

## **Lista de Símbolos**

$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\%$	Por cem
$>$	Maior
$<$	Menor
$\leq$	Menor ou igual
h	Hora
kg	Kilograma
mg	Milograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
mL	Mililitro
n	Número de amostras

## **Sumário**

<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3 Artigos.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Artigo 1.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Artigo 2.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Artigo 3.....</b>	<b>59</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>86</b>
<b>Referências.....</b>	<b>87</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>101</b>

## 1 Introdução

A esporotricose, anteriormente considerada uma micose subcutânea esporádica e restrita a certas regiões do Brasil, emergiu de forma significativa a partir do início da década de 1990, especialmente com o aumento dos casos em felinos (BARROS *et al.*, 2001; BARROS *et al.*, 2004; NOBRE *et al.*, 2001). Desde então, a enfermidade passou por um processo de expansão geográfica e epidemiológica, ultrapassando as fronteiras nacionais e sendo reconhecida como um problema de saúde pública em diversos países da América Latina e em outros continentes. O agente *Sporothrix brasiliensis*, altamente virulento e com potencial zoonótico, tem sido o principal responsável por essa disseminação. O avanço dos casos e a capacidade de transmissão entre animais e humanos refletem a importância de medidas de controle e vigilância global da doença (GREMIÃO *et al.*, 2020).

Na atualidade, a esporotricose humana está cada vez mais relacionada ao contato com felinos domésticos, pois essa espécie é a mais suscetível à infecção por *Sporothrix* spp., desenvolvendo múltiplas lesões cutâneas que apresentam uma grande quantidade de células leveduriformes (ou seja, alta carga fúngica) nas lesões, diferindo das demais espécies (MADRID *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2018b; SCHUBACH *et al.*, 2004). Assim, os gatos têm um alto potencial zoonótico para transmissão de *Sporothrix* e desempenham um papel importante na cadeia epidemiológica da esporotricose, disseminando a doença não apenas intraespécies, mas também interespécies (POESTER *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020). Logo, a esporotricose felina precede o aumento de casos humanos, o que representa um preocupante problema de saúde pública (POESTER *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Pouco se conhece sobre a imunidade dos felinos, frente à infecção por *Sporothrix* spp. e um perfil de resposta ainda não foi evidenciado. Sabe-se que a imunidade produzida por células T auxiliares do tipo 1 (Th1) é a principal proteção para infecções por fungos intracelulares (ABBAS *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2015). Assim, o principal meio de defesa do organismo contra os fungos está na sua

destruição mediada por fagócitos, que produzem óxido nítrico (NO) e outros componentes. Esse efeito, assim como a função dos neutrófilos, é potencializado pela produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (MACHADO *et al.*, 2004). Além disso, as lesões em gatos predispõem a formação de granulomas incapazes de conter a disseminação da doença (MIRANDA *et al.*, 2013), salientando o aumento dos linfócitos T CD8+ e falhas na resposta imune celular do gato (MIRANDA *et al.*, 2016) ou altos níveis de IL-10 durante FIV e/ou coinfecções por FeLV, e baixos níveis de IL-4 (FeLV positivo) e IL-12 (FIV- positivo) (MIRANDA *et al.*, 2018a), o que sugere desenvolver apresentações clínicas graves nos felinos. Essas condições imunológicas que são pertinentes à espécie felina parecem dificultar a cura durante uma infecção por *S. brasiliensis*, mesmo com tratamento antifúngico adequado.

O tratamento da esporotricose felina é um desafio, pois o número de antifúngicos orais é limitado e esses agentes apresentam efeitos adversos e alto custo (GREMIÃO *et al.*, 2015). A esporotricose tem como tratamento padrão os antifúngicos, e para cães e gatos o itraconazol (ITZ) é recomendado como primeira opção (GREMIÃO *et al.*, 2015). A associação de ITZ ao iodeto de potássio em cápsulas foi demonstrado como uma alternativa efetiva e segura, principalmente, no tratamento da esporotricose felina refratária ao ITZ (REIS *et al.*, 2016; DA ROCHA, 2018), assim como a associação de ITZ e de anfotericina B intralesional (AFB IL) (GREMIÃO *et al.*, 2011). Além disso, o tratamento é longo e deve ser continuado por pelo menos um mês após o desaparecimento dos sinais clínicos (CHAVES *et al.*, 2013; GREMIÃO *et al.*, 2020; LLORET *et al.*, 2013).

Entretanto, muitos casos são comprovadamente refratários ao antifúngico convencional, assim é crescente o número de casos com falhas terapêuticas. Vários fatores podem comprometer a cura clínica, como escolha do medicamento e doses terapêuticas (KINNISON *et al.*, 2015), a administração terapêutica sendo fornecida conforme prescrito pelo veterinário (SIVÉN *et al.*, 2017), susceptibilidade antifúngica (BORBA-SANTOS *et al.*, 2015; BRILHANTE *et al.*, 2016; STOPIGLIA *et al.*, 2014), entre outros. A falha do tratamento associada à baixa susceptibilidade de *Sporothrix brasiliensis* a ITZ tem sido descrita em estudos recentes que demonstraram resistência de *Sporothrix brasiliensis* frente a diferentes marcas comerciais e compostos (WALLER *et al.*, 2020), a resistência *in vitro* de *Sporothrix brasiliensis* correlacionado com falha terapêutica *in vivo* (NAKASU *et al.*, 2020).

Contudo, reafirma a necessidade de rever as alternativas dentro do compêndio farmacológico e formas de tratamento. Dentre essas, pode-se citar a associação de estimulantes do sistema imunológico com antifúngicos tradicionais como promissoras (FORLANI *et al.*, 2021; GUTERRES *et al.*, 2014). Considerando o papel da imunidade celular, modulação da inflamação granulomatosa (FORLANI *et al.*, 2021) e retrovíroses em gatos, drogas que auxiliam o sistema imunológico podem ser particularmente benéficas para esses pacientes. A timomodulina é um extrato tímico que promove a modulação de linfócitos T e B e contribui para ação de vários tipos de células de defesa como neutrófilos, linfócitos e macrófagos, necessárias para o controle de micoses (ANDRADE, 2017; FORLANI *et al.*, 2018). Em pesquisas recentes o uso de timomodulina como terapia adjuvante associada a ITZ e iodeto de potássio ocasiona em menor tempo de remissão dos sinais clínicos extracutâneos, melhora o prognóstico e sobrevida de gatos com esporotricose cutânea disseminada num estudo prospectivo (FORLANI *et al.*, 2021).

Em nossos estudos foram determinados à ação cicatrizante de duas formulações com ativos de extratos vegetais de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* (registro de solicitação de Patente junto ao INPI n° BR 10 2018 069700 5) para uso em feridas cutâneas abertas de pequenos animais. O potencial cicatrizante destes ativos foi estabelecido separadamente e sua ação conjugada comprovada em estudos pré-clínicos e clínicos no público-alvo. Assim como ação antibacteriana frente a bactérias do gênero *Staphylococcus* (dados ainda não publicados).

Em estudo pré-clínico, em modelo murino, de efeito frente a lesões térmicas demonstrou-se que as formulações exacerbaram a inflamação e a angiogênese, permitindo maior perfusão do infiltrado inflamatório e a intensificação deste, agindo de forma expressiva, o que reflete um efeito pró inflamatório (CAPELLA *et al.*, 2020). No público-alvo, cães e gatos, comprovou-se que as formulações proporcionaram, uma melhor circulação no local lesionado com o aumento do infiltrado inflamatório, o que permite a ação de células de defesa do organismo limpando o local e o desenvolvimento de intensa rede de fibrina resultando numa barreira protetora local, principalmente para lesões cutâneas extensas com risco de contaminação. Além disso, houve uma maior formação e organização das fibras colágenas em menor tempo de tratamento no processo cicatricial, acelerando a fase de maturação da lesão e tornando a cicatriz mais resistente e elástica. Observou-se em felinos e caninos a

aceleração do processo cicatricial, o que otimizou o tratamento obtendo a cura clínica em menor tempo. Ainda se verificou que a apresentação em creme, permite a hidratação da lesão cutânea e a melhor absorção ativos. Além de facilitar a aplicação do produto de forma uniforme, reduzindo o tempo de manipulação e possíveis desconforto dos animais.

Considerando o aumento da frequência de gatos com esporotricose no Brasil, o aumento de relatos de casos humanos decorrentes da transmissão zoonótica, a dificuldade na terapêutica de felinos, é evidente a necessidade de avaliar tratamentos que possam melhorar a resposta imunológica como adjuvantes na esporotricose felina. O estudo propõe um tratamento adjuvante ao uso do itraconazol, atuando de forma sistêmica estimulando o sistema imune do animal frente ao fungo, ao mesmo tempo que de forma tópica acelera a cicatrização das lesões cutâneas da esporotricose assim reduzindo a evolução dos casos em felinos para quadros graves, reduzindo tempo de tratamento e de risco de transmissão. Nesse contexto, a presente tese teve como objetivo central elucidar, através de três estudos, a ação da timomodulina e das formulações tópicas como adjuvante no tratamento da esporotricose em modelo murino e em felinos. Assim, originou três artigos, para os periódicos Revista Observatório de La Economia Latinoamericana, *Mycoses e Ciência Animal*.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Realizar teste pré-clínicos, *in vitro*, *in vivo* e ensaio clínico. Determinar a ação das formulações contendo os ativos vegetais urucum e trigo, e da timomodulina no tratamento de esporotricose experimental em modelo murino e em felinos naturalmente infectados.

### **2.2 Objetivo Específicos**

- Determinar concentração inibitória mínima e fungicida de urucum e trigo, interação entre esses compostos com fármaco de eleição.
- Avaliar clinicamente a ação das formulações e timomodulina nas lesões cutâneas de esporotricose em modelo murino durante o período experimental;
- Avaliar o efeito das formulações e da timomodulina na redução do número de células de *S. brasiliensis* nas lesões de esporotricose induzida em modelo murino;
- Avaliar o efeito das formulações e da timomodulina no processo inflamatório e na cicatrização das lesões de esporotricose induzida em modelo murino;
- Avaliar a ação da formulação tópica com melhor desempenho no modelo murino e da timomodulina associado ao antifúngico convencional no tratamento da esporotricose felina;



**Extractos de urucum e trigo como alternativa fitoterápica contra *Sporothrix* spp.**

**Annatto and wheat extracts as phytotherapeutic alternatives against *Sporothrix* spp.**

**Extractos de urucú y trigo como alternativas fitoterapéuticas frente a *Sporothrix* spp.**

DOI: 10.55905/oelvXXnX

Receipt of originals: 01/23/2024

Acceptance for publication: 02/19/2024

**Martha Bravo Cruz Piñeiro**  
 Mestre em Ciência Animal  
 Universidade Federal de Pelotas  
 Endereço: Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil  
 E-mail: martha.pineiro@hotmail.com

**Stefanie Bressan Waller**  
 Pós-doutorado em Biotecnologia  
 Universidade Federal de Pelotas  
 Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil  
 E-mail: waller.stefanie@yahoo.com.br

**Sabrina de Oliveira Capella**  
 Pós-doutorado em Medicina Veterinária  
 Universidade Federal de Pelotas  
 Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil  
 E-mail: capellas.oliveira@gmail.com

**Renata Osório de Faria**  
 Doutora em Ciências Veterinárias  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
 Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil  
 E-mail: [renataosoriovet@gmail.com](mailto:renataosoriovet@gmail.com)

**Marlete Brum Cleff**  
 Doutora em Ciências Veterinárias  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
 Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil  
 E-mail: marletecleff@gmail.com

**Rogério Antonio Freitag**  
 Doutor em Química  
 Universidade Federal de Santa Maria  
 Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil  
 E-mail: rafreitag@gmail.com

**Márcia de Oliveira Nobre**  
 Doutora em Ciências Veterinárias  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
 Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil  
 E-mail: marciaonobre@gmail.com

## RESUMO

A esporotricose, zoonose emergente no Brasil, é causada por fungos do complexo *Sporothrix*, com destaque para a espécie *S. brasiliensis*. Diante da resistência crescente ao tratamento convencional com itraconazol e da limitada disponibilidade de antifúngicos eficazes, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de extratos vegetais de *Bixa orellana* L (urucum) e *Triticum aestivum* (trigo) frente a 16 isolados clínicos de *Sporothrix* spp. Foram preparados extratos oleosos de urucum, aquoso e etanólico de trigo, e sua atividade antifúngica foi testada por microdiluição em caldo segundo as diretrizes CLSI M38-A2. O extrato oleoso de *B. orellana* demonstrou atividade inibitória e fungicida contra todos os isolados testados, com CIMs variando de 0,0156 a 1 mg/mL. O extrato etanólico de trigo apresentou atividade moderada frente a alguns isolados, enquanto o extrato aquoso foi ineficaz. Testes de sinergismo entre os extratos e o itraconazol indicaram interações antagônicas. Conclui-se que o extrato oleoso de *B. orellana* é um candidato promissor para formulações fitoterápicas, enquanto o uso combinado com antifúngicos convencionais deve ser avaliado com cautela.

**Palavras-chave:** Antifúngicos, Esporotricose, Fitoterapia, *Bixa orellana* L, *Triticum aestivum*, Sinergismo.

## ABSTRACT

Sporotrichosis, an emerging zoonosis in Brazil, is caused by fungi of the *Sporothrix schenckii* complex, with *S. brasiliensis* being the most prominent species. Given the increasing resistance to conventional treatment with itraconazole and the limited availability of effective antifungal agents, this study aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activity of plant extracts from *Bixa orellana* L(annatto) and *Triticum aestivum* (wheat) against 16 clinical isolates of *Sporothrix* spp. Oil extracts of annatto and aqueous and ethanolic extracts of wheat were prepared, and their antifungal activity was tested using the broth microdilution method according to CLSI M38-A2 guidelines. The oil extract of *B. orellana* showed inhibitory and fungicidal activity against all tested isolates, with MICs ranging from 0.0156 to 1 mg/mL. The ethanolic wheat extract showed moderate activity against some isolates, while the aqueous extract was ineffective. Synergy tests between the extracts and itraconazole indicated antagonistic interactions. It is concluded that the oil extract of *B. orellana* is a promising candidate for phytotherapeutic formulations, while its combined use with conventional antifungal agents should be carefully evaluated.

**Keywords:** Antifungals, Sporotrichosis, Phytotherapy, *Bixa orellana* L., *Triticum aestivum*, Synergism.

## RESUMEN

La esporotricosis, una zoonosis emergente en Brasil, es causada por hongos del complejo *Sporothrix schenckii*, destacándose la especie *S. brasiliensis*. Ante la creciente resistencia al tratamiento convencional con itraconazol y la limitada disponibilidad de antifúngicos eficaces, este estudio tuvo como objetivo evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos vegetales de *Bixa orellana* L (urucú) y *Triticum aestivum* (trigo) frente a 16 aislamientos clínicos de *Sporothrix* spp. Se prepararon extractos oleosos de urucú, y extractos acuosos y etanólicos de trigo, y su actividad antifúngica fue evaluada mediante microdilución en caldo, siguiendo las directrices del CLSI M38-A2. El extracto oleoso de *B. orellana* demostró actividad inhibitoria y fungicida contra todos los aislamientos evaluados, con CIMs entre 0,0156 y 1 mg/mL. El extracto etanólico de trigo presentó actividad moderada frente a algunos aislamientos, mientras que el extracto acuoso fue ineficaz. Las pruebas de sinergia entre los extractos y el itraconazol indicaron interacciones antagónicas. Se concluye que el extracto oleoso de *B. orellana* es un candidato prometedor para formulaciones fitoterapéuticas, mientras que el uso combinado con antifúngicos convencionales debe evaluarse con cautela.

**Palabras clave:** Antifúngicos, Esporotricosis, Fitoterapia, *Bixa orellana* L., *Triticum aestivum*, Sinergia.

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos do complexo *Sporothrix*, com crescente relevância no Brasil, especialmente devido à forma zoonótica transmitida por felinos, que tem gerado surtos urbanos com impacto na saúde pública e na medicina veterinária (Silva *et al*, 2015; Gremião *et al*, 2017). Atualmente, é considerada uma zoonose endêmica no país, com alta prevalência em felinos e humanos, consolidando-se como um importante problema de saúde pública (Poester *et al*, 2018).

O tratamento padrão envolve antifúngicos como o itraconazol, porém sua eficácia pode ser limitada em casos de esporotricose disseminada, em pacientes imunocomprometidos ou quando há infecção por cepas mais virulentas, como *Sporothrix brasiliensis*, frequentemente associada a quadros mais graves e refratários (Silva *et al*, 2012; Oliveira *et al*, 2022). Além disso, a resposta terapêutica é frequentemente lenta e prolongada, podendo se estender por meses, o que favorece abandonos de tratamento e recidivas (Nakasu *et al.*, 2021; Oliveira *et al*, 2022). A refratiedade clínica, especialmente em felinos, está relacionada a fatores como baixa biodisponibilidade oral dos antifúngicos, resistência fúngica (Waller *et al*, 2021a) e dificuldades no manejo da infecção cutâneo-mucosa extensa (Silva *et al*, 2020; Nakasu *et al*, 2021). O número de opções antifúngicas eficazes é limitado, com destaque para itraconazol, terbinafina e anfotericina B, sendo que esta última, apesar de potente, apresenta alta toxicidade e necessidade de uso parenteral (Queiroz-Telles *et al*, 2017; Oliveira *et al*, 2022). A busca por

novos compostos antifúngicos é desafiada por dificuldades intrínsecas à biologia dos fungos, como sua semelhança metabólica com células eucarióticas humanas, o que restringe alvos terapêuticos viáveis e seguros (Queiroz-Telles *et al*, 2017; Wiederhold *et al*, 2017).

Diante das limitações associadas ao tratamento da esporotricose e da necessidade de alternativas terapêuticas eficazes e menos tóxicas, o estudo de compostos naturais com potencial antifúngico e cicatrizante torna-se uma estratégia promissora. Em plantas *Bixa orellana* (Bixaceae) e *Triticum aestivum* (Poaceae), respectivamente conhecidas por urucum e trigo, estudos recentes tem revelado atividade antifúngica contra *Aspergillus* sp. (Hu *et al*, 2022) e *Candida albicans* (Poma-Castillo; Espinoza, 2019), porém, não há estudos frente a *Sporothrix* spp.

Adicionalmente, estudos anteriores determinaram a ação cicatrizante de formulações contendo ativos de *Bixa orellana* e *Triticum aestivum* para uso em feridas cutâneas abertas de pequenos animais, demonstrando eficácia tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos no público-alvo (Tillmann *et al*, 2014; Capella *et al*, 2016; Capella *et al*, 2020). Em modelo murino desenvolvido pelo grupo de pesquisa, demonstrou-se ainda que o uso da timomodulina associada a uma formulação contendo extrato oleoso de urucum e extrato etanólico de trigo como adjuvante no tratamento da esporotricose foi capaz de otimizar o efeito do itraconazol, acelerando a cicatrização e potencializando sua ação antifúngica (dados ainda não publicados).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar pela primeira vez a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico de *Triticum aestivum* e do extrato oleoso de *Bixa orellana* frente a isolados clínicos de *Sporothrix* spp., visando contribuir para a identificação de possíveis agentes terapêuticos complementares no manejo da esporotricose.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ATIVIDADE ANTIFUNGICA DOS EXTRATOS

O *Triticum aestivum*, popularmente conhecido como trigo, tem demonstrado potencial atividade antifúngica em diversos estudos, especialmente quando utilizados extratos de suas partes jovens, como a grama de trigo (wheatgrass). Essa ação está associada à presença de compostos bioativos como flavonoides, ácidos fenólicos e peptídeos antimicrobianos naturais, que atuam desestabilizando a parede celular e a membrana de fungos patogênicos (Kothari *et al*, 2011; Kumar *et al*, 2013). Pesquisas *in vitro* indicam eficácia moderada contra microrganismos como *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (Kothari *et al*, 2011), sugerindo seu possível uso como agente fitoterápico complementar. Apesar de promissora, a atividade antifúngica do *T. aestivum* ainda requer estudos mais aprofundados, especialmente quanto à

padronização de extratos e avaliação contra fungos de importância clínica, como os do gênero *Sporothrix* (Singh, Verma, Mishra, 2015).

O extrato oleoso de *Bixa orellana* L. (urucum) tem sido estudado por seu potencial antifúngico, sobretudo devido à presença de carotenoides lipossolúveis, como bixina e norbixina, além de compostos triterpênicos e fenólicos que se concentram na fração lipídica da planta (Silva *et al*, 2008; Nascimento, Oliveira, Mota 2007). Estudos *in vitro* demonstraram que o extrato oleoso obtido das sementes apresenta atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e fungos dermatofíticos, promovendo zonas de inibição visíveis em testes de difusão em ágar e microdiluição (Nascimento, Oliveira, Mota, 2007; Barros *et al*, 2015). Acredita-se que o mecanismo de ação esteja relacionado à alteração da integridade da membrana plasmática fúngica, aumento da permeabilidade celular e possível interferência na síntese de ergosterol (Barros *et al*, 2015). Em comparação com extratos aquosos ou alcoólicos, o extrato oleoso mostrou-se eficaz em concentrações mais baixas, o que pode estar relacionado à melhor penetração lipofílica nas estruturas fúngicas (Silva *et al*, 2008; Barros *et al*, 2015). Apesar dos resultados promissores, ainda são necessários ensaios toxicológicos e *in vivo* para garantir a segurança e viabilidade do uso terapêutico do extrato oleoso de *B. orellana*.

## 2.2 CROMATOGRAFIA DOS EXTRATOS

A análise cromatográfica metabólica do extrato oleoso de *Bixa orellana* L. por GC/MS permitiu a identificação de diversos compostos bioativos, principalmente hidrocarbonetos aromáticos, sesquiterpenos e álcoois triterpênicos. Dentre os principais metabólitos detectados estão o anetol, o esqualenol, a  $\gamma$ -tocoferol, além de esteróis como estigmasterol,  $\gamma$ -sitosterol e fucosterol, que são reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Capella *et al*, 2020). A presença de ácidos graxos foi confirmada em uma análise complementar, sendo identificados compostos como ácido linoleico, linolênico, oleico e esteárico, todos com reconhecida ação biológica relevante, incluindo propriedades anti-inflamatórias e função estrutural em membranas celulares (Capella *et al*, 2020).

Já na espécie *Triticum aestivum*, a análise comparativa dos extratos etanólico e aquoso por LC-MS/MS revelou diferenças significativas no perfil metabólico entre os dois tipos de extração. O extrato etanólico apresentou maior concentração de compostos fenólicos, como ácido ferúlico, vanílico e salicílico, enquanto o extrato aquoso se destacou pela presença de catequina e menores teores de ácidos fenólicos detectados. Metabólitos com diferenças expressivas entre os extratos incluíram ácido ricinoleico (enriquecido no etanólico) e ácidos

dicarboxílicos como o maleico e o málico (reduzidos no etanólico), o que indica que o tipo de solvente influencia diretamente a extração de compostos bioativos (Capella *et al*, 2020).

O extrato etanólico de trigo foram encontrados os compostos 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienóico, ácido maléico, ácido pinélico, 5-5'-Ácido desidrodiferúlico e os compostos fenólicos ácido 4-Hidroxibenzeico, ácido caféico, catequina, ácido ferrúlico, ácido p-cumárico, ácido sinápico, ácido sírinico, ácido vanílico e ácido salicílico (Brito *et al*, 2021).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS E FITOTERÁPICOS

Os extratos vegetais foram obtidos a partir de sementes das plantas *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum*, adquiridas comercialmente com origem certificada e ficha técnica. As sementes das plantas foram secas e trituradas para aumentar a superfície de contato, favorecendo as extrações.

As técnicas utilizadas foram segundo Capella *et al* (2020). Para as sementes de *Bixa orellana* L. utilizou-se a técnica Sohlet com hexano como solvente, a uma temperatura de 68º C, por seis horas. O óleo fixo obtido passou pelo evaporador rotativo para remoção do solvente e obtenção do óleo de urucum purificado. O óleo foi, então, acondicionado em refrigerador (4°C), ao abrigo da luz, até sua utilização. Enquanto para as sementes de *Triticum aestivum* utilizou-se duas formas distintas. A primeira pela técnica de sonificação por ultra-som, utilizando 50 gramas de trigo em 500mL de água destilada mantidos em sonificação durante 30 minutos, obtendo um extrato aquoso. Após o extrato foi filtrado, liofilizado e armazenado em ultrafreezer -80°C. A segunda técnica utilizada para obtenção de um extrato etanólico, ocorreu pela mesma técnica de sonificação por ultra-som, utilizando 25g de sementes em 150mL de solvente álcool-etílico, mantidos em sonificação durante 30 minutos. Após o solvente foi eliminado em um rotaevaporador e o extrato armazenado em ultrafreezer -80°C.

#### 3.2 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Para o ensaio de suscetibilidade antifúngica, a técnica de microdiluição em caldo foi realizada de acordo com as diretrizes M38-A2 (CLSI, 2008) contra *Sporothrix* spp. Para esse teste, foram utilizados 14 isolados clínicos de *S. brasiliensis* obtidos de gatos ( $n=12$ ) e cães com esporotricose ( $n=2$ ) e as cepas identificadas por análise molecular do Laboratório de Micologia Médica e Molecular (UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil). Cepas padrão de *S. brasiliensis* ( $n=1$ ); Ss177 IPEC 16919- Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de

Janeiro, RJ, Brasil; FMR 8314- Facultat de Medicina i Ciencies de la Salut, Reus, Espanha) e de *S. schenckii* (n=1; IOC 1226- Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro/RJ, Brasil) da esporotricose humana foram também testados, totalizando 16 isolados.

Os isolados clínicos foram armazenados na coleção de micologia do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (Federal Universidade de Pelotas, Brasil). A identificação fúngica foi realizada por meio de análises macro e micromorfológicas das colônias. A identificação molecular foi realizada por polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP), usando digestão com endonuclease de restrição (Rodrigues et al., 2013).

Cada inóculo fúngico foi preparado individualmente a partir da respectiva subcultura em fase micelial em ágar batata dextrose (Acumedia, Lansing, MI, EUA) a 27°C por sete dias para promover a formação de conídios. Cada inóculo foi suspenso em solução salina estéril e a concentração foi ajustada usando um espectrofotômetro ultravioleta (Spectrum Instruments Co., Shanghai, China) em uma densidade óptica de 80-82% e 530 nm de transmitância. As suspensões fúngicas ajustadas foram diluídas em RPMI-1640 (médio do Roswell Park Memorial Institute, Sigma, Steinheim, Alemanha) contendo MOPS (3-(N-morfolino) ácido propano-sulfônico) e suplementação com 2% de glicose no um pH de 7,0, para obter um inóculo final de intervalo de 10<sup>4</sup> UFC/mL (colônia unidades formadoras).

A partir da concentração inicial, dez diluições seriadas foram realizadas em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS diretamente em microplacas para obter uma concentração final de 8 a 0,0156 mg/mL de extrato oleoso de *B. orellana* L.; de 1 a 0,00195- mg/mL de extrato etanólico de *T. aestivum* e de 1 a 0,00195 mg/mL de extrato aquoso de *T. aestivum*.

Em microplacas de 96 poços, positivo (100 µL de suspensão de conídios e 100 µL de RPMI-1640) e controles negativos (200 µL RPMI-1640) foram utilizados para confirmar o crescimento fúngico normal e a esterilidade do meio de cultura, respectivamente. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 h e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinado visualmente por comparação com poço livre de crescimento (controle negativo). O valor da CIM foi designado como o menor valor capaz de impedir o crescimento fúngico visível. Para a concentração fungicida mínima (CFM), alíquotas de 10 µl dos poços sem crescimento fúngico foram transferidos para placas de Petri contendo Agar Sabouraud dextrose (Acumedia, MI, EUA) e incubado a 35 °C por 72 h para visualizar o crescimento de fungos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Embora não haja ponto de corte para espécies de *Sporothrix* spp., como critério de sensibilidade neste estudo, seguimos o valor de

corte epidemiológico (ECV) proposto por Espinel-Ingroff *et al.* (2017), que afirma que valores de CIM < 2  $\mu$ g/mL e  $\geq$  2  $\mu$ g/mL podem ser considerados sensíveis e resistentes ao itraconazol, respectivamente.

### 3.2 TESTE DE SINERGISMO

O ensaio *checkboard* com poucas modificações conforme metodologia empregada por Danielli *et al* (2018) para determinar a interação entre itraconazol e extrato oleoso de *B. orellana* L. (ITRA x URU); itraconazol e extrato etanólico de *T. aestivum* (ITRA x ETA); e extrato oleoso de *B. orellana* L. e extrato etanólico de *T. aestivum* (URU x ETA) contra quatro fungos *S. brasiliensis* já sequenciados sendo dois sabidamente sensíveis ao itraconazol (S69 e S127) e outros dois sabidamente resistentes ao itraconazol (R99 e R113).

Para o teste, um total de 64 combinações entre o composto selecionado e o itraconazol foi testado em concentrações variando de MIC/8 a 8 $\times$ MIC. A interação entre os compostos foi definida pelo índice de concentração inibitória fracionada (FICI), obtido pela soma dos FICs de cada substância. Para a interpretação, a interação foi considerada sinérgica quando o valor foi  $\leq$ 0,5; aditiva quando entre >0,5 e <1,0; indiferente quando entre  $\geq$ 1,0 e  $\leq$ 4,0; e antagonista quando >4,0. O ensaio foi realizado em duplicata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA

No teste de suscetibilidade o extrato oleoso de *B. orellana* L. apresentou atividade inibitória e fungicida contra todos *Sporothrix* spp., e os valores de CIM variaram de 1 a 0,0156 mg/ml, enquanto os valores de CFM variaram de 1 a 0,03 mg/ml. Já o extrato etanólico de *T. aestivum* apresentou valores de CIM para alguns isolados de *S. brasiliensis* da espécie felina (33%; 4/12) de 1mg/ml; e de CFM >1 mg/ml, mesmo valores foram apresentados contra os isolados de *Sporothrix* spp. de humanos, somente para um isolado de *S. brasiliensis* da espécie canina sendo valor de CIM de 0,25mg/ml e a CFM demonstrou valor de 1mg/ml. O extrato aquoso de *T. aestivum* não apresentou atividade inibitória e fungicida contra todos isolados de *Sporothrix* spp na concentração máxima testada, enquanto os extratos oleoso de *B. orellana* L. e etanólico de *T. aestivum* isolados apresentam ação antifúngica (Tabela 1) demonstrando promissora ação para os estudos *in vivo*.

Tabela 1- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de extratos oleoso de urucum (*B. orellana L.*), aquoso e etanólico de trigo (*T. aestivum*) contra *Sporothrix brasiliensis* e *S. schenckii* obtido de humanos e animais.

Código	Espécie fúngica	Hospedeiro	OE URUCUM (mg/mL)		AQUOSO TRIGO (mg/ml)		ETANOLICO TRIGO (mg/ml)	
			CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
S45	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,06	0,5	n.i.	>1	1	>1
S59	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,0156	0,03	n.i.	>1	1	>1
S68	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,25	0,25	n.i.	>1	n.i.	>1
S69	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,03	0,25	n.i.	>1	n.i.	>1
S99	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,25	0,25	n.i.	>1	n.i.	>1
S103	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,125	1	n.i.	>1	1	>1
S113	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,25	0,25	n.i.	>1	n.i.	>1
S126	<i>S. brasiliensis</i>	Canino	0,125	0,125	n.i.	>1	n.i.	>1
S127	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,06	0,125	n.i.	>1	n.i.	>1
S135	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,06	0,125	n.i.	>1	n.i.	>1
S143	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,25	0,25	n.i.	>1	n.i.	>1
S144	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	1	1	n.i.	>1	n.i.	>1
S151	<i>S. brasiliensis</i>	Canino	0,125	0,125	n.i.	>1	0,25	>1
S154	<i>S. brasiliensis</i>	Felinos	0,03	0,03	n.i.	>1	1	>1
IOC 1226	<i>S. schenckii</i>	Humano	0,0156	0,06	n.i.	>1	1	>1
Ss177	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	0,125	0,125	n.i.	>1	1	>1

<sup>a</sup>Faixa de concentração testada: 8-0,0156 mg/mL (extrato oleoso de *B. orellana L.*- OE urucum); 1-0,00195 mg/mL (extrato etanólico de *T. aestivum*- ETA trigo); 1- 0,00195 mg/mL (extrato aquoso de *T. aestivum*-AQU trigo); <sup>b</sup> As linhas “S” são *Sporothrix brasiliensis* e pertencem ao acervo de cultura da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, RS, Brasil; <sup>c</sup> As linhagens “Ss! Pertencem ao acervo de culturas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, SP, Brasil) - Ss177, cepa padrão *Sporothrix brasiliensis* (outros códigos: FMR 8314, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Espanho, IPEC 16968, Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/FIOCRUZ, RJ, Brasil); IOC 1226 cepa padrão *Sporothrix schenckii*.

ni: nenhuma atividade inibitória nas concentrações testadas; nf: nenhuma atividade fungicida nas concentrações testadas.

Os extratos vegetais testados demonstraram perfis distintos de atividade antifúngica frente a cepas do complexo *Sporothrix schenckii*, incluindo isolados de origem felina, canina e humana. O extrato oleoso de urucum (*Bixa orellana L.*) apresentou resultados consistentes de inibição e efeito fungicida contra todas as linhagens avaliadas. As concentrações inibitórias mínimas variaram de 1 a 0,0156 mg/mL, enquanto as concentrações fungicidas mínimas oscilaram entre 1 a 0,03 mg/mL. Os isolados fúngicos S59 (felino) e IOC 1226 (humano) demonstraram alta sensibilidade, com CIMs de 0,0156 mg/mL e CFMs de até 0,06 mg/mL. Esse perfil sugere que os constituintes bioativos do urucum, como bixina e norbixina, possuem atividade antifúngica potente, corroborando estudos anteriores que evidenciam o potencial antimicrobiano desse fitoterápico (Cunha *et al*, 2019; Lima *et al*, 2020).

Em contrapartida, o extrato aquoso de trigo (*Triticum aestivum*) não demonstrou atividade antifúngica nas concentrações testadas (1 a 0,00195 mg/mL). Isso sugere que os compostos hidrossolúveis extraídos do trigo não possuem efeito relevante frente ao gênero *Sporothrix*. Essa ausência de eficácia pode estar relacionada à menor concentração ou ausência de metabolitos secundários antifúngicos em frações aquosas, conforme também relatado por Ribeiro *et al* (2018), que observaram maior eficácia em extratos etanólicos comparados aos aquosos de diversas gramíneas.

Já o extrato etanólico de trigo demonstrou atividade antifúngica moderada em alguns isolados, apresentando CIMs de 1 mg/mL em isolados como S45, S59, S103, S154, IOC 1226 e Ss177. No entanto, os valores de CFM ultrapassaram 1 mg/mL na maioria desses casos, indicando um efeito predominantemente inibitório, sem fungicida significativo. A exceção foi a linhagem canina S151, com CIM de 0,25 mg/mL e CFM de 1 mg/mL, sugerindo uma leve ação fungicida. Extratos etanólicos são conhecidos por apresentar melhor extração de compostos fenólicos e lipofílicos, que frequentemente estão associados à atividade antifúngica (Alves *et al*, 2021). No entanto, os resultados modestos aqui obtidos indicam que o trigo, mesmo na forma etanólica, possui baixa concentração de compostos eficazes contra *Sporothrix spp.*, ou que tais compostos atuam de forma limitada neste gênero fúngico.

Os resultados obtidos apontam para o extrato oleoso de urucum como o mais promissor entre os testados. A eficácia frente a múltiplas linhagens, inclusive da espécie *S. brasiliensis*, que é altamente prevalente em surtos zoonóticos de esporotricose no Brasil (Rodrigues *et al*, 2014), reforça seu potencial como agente antifúngico alternativo. A atividade observada, tanto inibitória quanto fungicida, torna o urucum um candidato relevante para futuros estudos em modelos *in vivo* e formulações terapêuticas fitoterápicas.

#### 4.2 TESTE DE SINERGISMO

O teste de sinergismo apresentou antagonismo na combinação entre extrato oleoso de *B. orellana* L e extrato etanólico de *T. aestivum*, assim como na combinação entre o extrato oleoso de *B. orellana* L. e itraconazol e extrato etanólico de *T. aestivum* e itraconazol (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) do extrato de urucum, extrato etanólico de trigo (mg/mL) e itraconazol ( $\mu$ g/mL) em combinações contra *Sporothrix brasiliensis* sensíveis e resistentes ao itraconazol.

S. <i>brasiliensis</i>	CIM		CIM em combinação		CIM em combinação		CIM em combinação		CIM em combinação		ICIF R.I.
	URU	ETA	URU	ETA	URU	ITZ	ICIF	R.I.	ETA	ITZ	
Sensível ao itraconazol (n=2)											
S69	0,12	4	2	0,48	4	5	ANT	0,48	4	6	ANT
S127	0,24	4	2	0,96	4	6	ANT	0,96	4	6	ANT
Resistente ao itraconazol (n=2)											
R99	0,5	4	8	4	4	9	ANT	1	16	4	ANT
R113	0,25	4	32	4	4	17	ANT	1	128	6	ANT

ANT, antagônico; ETA, extrato etanólico de trigo; ITZ, itraconazol; URU, óleo essencial de urucum; R.I. resultado da interpretação

Os testes de susceptibilidade realizados com cepas de *Sporothrix brasiliensis*, tanto sensíveis quanto resistentes ao itraconazol, revelaram que o extrato oleoso de urucum (URU),

o extrato etanólico de trigo (ETA) e o antifúngico itraconazol (ITZ), quando utilizados em combinações, apresentaram interações antagônicas em todos os casos avaliados. As cepas sensíveis (S69 e S127) apresentaram CIMs de ITZ entre 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , consistentes com padrões de sensibilidade esperados (OLIVEIRA *et al.*, 2011). No entanto, os índices de concentração inibitória fracionada (ICIF) nas combinações URU + ETA, URU + ITZ e ETA + ITZ variaram entre 5 e 12, caracterizando interações antagônicas (ICIF  $> 4$ ) conforme os critérios estabelecidos por Odds (2003).

Para as cepas resistentes ao itraconazol (R99 e R113), os valores de CIM do ITZ foram elevados (8 a 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), confirmando o fenótipo de resistência previamente relatado para isolados clínicos de *S. brasiliensis* no Brasil (Gomes *et al.*, 2016). As combinações testadas resultaram novamente em interações antagônicas, com ICIFs variando de 4 a 17. Tais resultados indicam que os compostos naturais testados, ao invés de potencializar a ação antifúngica, podem interferir negativamente na eficácia do antifúngico de referência. Essa antagonização pode ser atribuída à competição por vias metabólicas fúngicas, à inibição de mecanismos sinérgicos ou até à formação de complexos que reduzem a biodisponibilidade dos ativos (Chen *et al.*, 2017).

Adicionalmente, os valores de CIM individuais para URU e ETA foram relativamente altos, variando entre 0,12 e 4  $\text{mg}/\text{mL}$ , sugerindo uma atividade antifúngica intrinsecamente fraca frente às cepas avaliadas. Apesar de estudos anteriores indicarem propriedades antimicrobianas do urucum e do trigo, esses efeitos parecem ser mais evidentes em bactérias ou fungos filamentosos de outras espécies (Rodrigues *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020). No caso de *Sporothrix spp.*, o perfil de resistência natural e a complexidade da parede celular podem limitar a penetração e eficácia desses extratos.

Esses achados destacam a importância de uma abordagem criteriosa ao se propor o uso combinado de compostos fitoterápicos com antifúngicos convencionais. Embora compostos naturais tenham se mostrado promissores como agentes adjuvantes em diversas infecções fúngicas (Rahman *et al.*, 2021), seus efeitos variam amplamente conforme a espécie-alvo, a formulação utilizada e o modo de administração. Assim, os dados aqui apresentados indicam que, nas concentrações testadas, as combinações de urucum, extrato de trigo e itraconazol não apenas são ineficazes, mas potencialmente prejudiciais, o que contraindica seu uso conjunto no tratamento da esporotricose causada por *S. brasiliensis*.

Entretanto, o extrato de urucum provoca a migração celular para a defesa local (Santos *et al*, 2014)., os extratos de trigo estimulam a multiplicação dos fibroblastos e a produção de tecido cicatricial *Triticum aestivum* ambém apresenta potencial no processo cicatricial, principalmente devido à presença de fitoestimulinas que agem sobre fibroblastos, os quais estimulam a capacidade de sintetizar fibras colágenas e glicosaminoglicana (Mastroinanni *et al*, 1988; Solórzano *et al.*, 2001). Um estudo utilizando a evolução da cicatrização de feridas em animais experimentais contendo diferentes concentrações de *Triticum* spp. demonstrou eficiência na cicatrização de feridas *in vivo* (Tillmann *et al*, 2018) outro estudo no tratamento de feridas em coelhos também demonstrou a eficiência na cicatrização principalmente devido à estimulação da força tensiométrica (Tillmann *et al*, 2014).

Em modelo murino desenvolvido pelo grupo de pesquisa, demonstrou-se ainda que o uso da timomodulina associada a uma formulação contendo extrato oleoso de urucum e extrato etanólico de trigo como adjuvante no tratamento da esporotricose foi capaz de otimizar o efeito do itraconazol, acelerando a cicatrização e potencializando sua ação antifúngica (dados ainda não publicados). Assim, mesmo os extratos não apresentando atividade antifúngica frente a *Sporothrix* spp. nas concentrações testadas, eles associados em um produto farmacológico acelera a cicatrização de pacientes com lesões de esporotricose pelo seu efeito cicatrizante.

## 5 CONCLUSÃO

O extrato oleoso de *Bixa orellana* apresentou relevante atividade antifúngica e fungicida frente a isolados clínicos de *Sporothrix* spp., incluindo isolados resistentes ao itraconazol, posicionando-se como uma alternativa fitoterápica promissora no tratamento da esporotricose. O extrato etanólico de *Triticum aestivum* apresentou eficácia limitada, e o extrato aquoso foi ineficaz. As interações antagônicas observadas *in vitro* indicam que o uso combinado dos extratos com itraconazol requer cautela. Estudos adicionais são necessários para compreender melhor essas interações. Futuros estudos devem investigar a caracterização fitoquímica detalhada, toxicidade e eficácia *in vivo* das formulações contendo *B. orellana*, bem como estratégias farmacotécnicas que evitem antagonismos terapêuticos.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – código de financiamento 001, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) – código de financiamento 308152/2019-0, à FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) – código de financiamento 19/2551-0001904-1, e à Universidade Federal de Pelotas, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, S. F. et al. Extraction methods and antifungal activity of phenolic compounds from cereals. **Food Research International**, v. 144, p. 110327, 2021.
- BARROS, M.; SANTOS, P. R.; RODRIGUES, A. B.; ALMEIDA, T. S. Ação antifúngica de extrato oleoso de urucum sobre *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. **Revista Pesquisa em Saúde**, v. 16, n. 1, p. 36–40, 2015.
- BRITO, Risciela Salardi Alves et al. Avaliação de extratos vegetais em formulações farmacêuticas no tratamento da otite externa canina. **Medicina Veterinária**, v. 15, n. 4, p. 332-339, 2021.
- CAPELLA, S. O. et al. Potencial cicatrizial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 104–112, 2016.
- CAPELLA, S.O. et al. Potencial terapêutico de Fármacos com ativos de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* no tratamento de lesões térmicas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 3, p. 29, 2020.
- CHEN, Y. et al. Synergistic interactions of natural compounds with antifungal drugs against *Candida species*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1286, 2017.
- CUNHA, L. C. et al. Antifungal activity of *Bixa orellana* L. (urucum): a review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 13, n. 6, p. 129–135, 2019.
- DANIELLI, L. J. et al. Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect *in vitro* with terbinafine and ciclopirox against dermatophytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 9, p. 1216–1227, 2018.
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. 10–1128, 2017.
- GOMES, R. R. et al. Molecular epidemiology of *Sporothrix brasiliensis* reveals geographical structure and association with feline outbreaks in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 121, 2016.
- GREMIÃO, I. D. F. et al. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.
- HU, ZHIBO et al. Sesquiterpenoids with phytotoxic and antifungal activities from a pathogenic fungus *Aspergillus alabamensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 38, p. 12065-12073, 2022.
- KOTHARI, S. K.; JAIN, A. K.; MEHTA, S. C.; TONPAY, S. D. Antibacterial and antifungal activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* Linn.). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 9, n. 1, p. 159–161, 2011.

KUMAR, G. P.; YADAV, S. K.; PANDEY, A. K. Phytochemical screening and antimicrobial activity of wheatgrass extract on bacterial and fungal pathogens. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1085–1090, 2013.

LIMA, M. L. et al. Antimicrobial and antioxidant potential of annatto seed extract. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 78, 2020.

MASTROINANNI, A. R. et al. Léstratto acquoso di "Triticum vulgare" - valutazione clinico-istologica Nei processi riparativi tissutali cutanei. **Giornale italiano di dermatologia e venereologia**, v.133, p.145-153, 1988.

NASCIMENTO, S. C.; OLIVEIRA, J. A.; MOTA, M. L. Avaliação da atividade antifúngica de extratos oleosos de *Bixa orellana* sobre fungos dermatofíticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 413–418, 2007.

NAKASU, C. C. T. et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 163-171, 2021.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* complex species to antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4805–4807, 2011.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex species: literature review and clinical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210518, 2022.

POMA-CASTILLO, L; ESPINOZA-POMA, M. Antifungal activity of ethanol-extracted *Bixa orellana* (L)(Achiote) on *Candida albicans*, at six different concentrations. **The journal of contemporary dental practice**, v. 20, n. 10, p. 1159-1163, 2018.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 2017.

RAHMAN, M. A. et al. Phytochemicals as alternative antifungal agents in the treatment of *Candida* infections – A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, p. 104879, 2021.

RIBEIRO, R. T. S. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous and ethanolic plant extracts. **Revista Fitoterá**, v. 12, n. 2, p. 137–144, 2018.

RODRIGUES, A. M. et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix*. 2013. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, e2281

RODRIGUES, A. M. et al. *Sporotrichosis* caused by *Sporothrix brasiliensis*: epidemiology, clinical manifestations, and treatment. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003552, 2014.

- RODRIGUES, A. M. et al. Emerging *sporotrichosis* is driven by clonal and recombinant *Sporothrix brasiliensis*. *Emerging Microbes & Infections*, v. 8, n. 1, p. 1478–1487, 2019.
- SANTOS, J. A. A. et al. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norboxina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais. Med.* 16(3):637–643 (2014)
- SILVA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; LIMA, E. O. Estudo da atividade antimicrobiana do extrato oleoso de *Bixa orellana* L. frente a microrganismos de interesse médico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 554–559, 2008.
- SILVA, J. N. et al. Resistance of *Sporothrix brasiliensis* to antifungal drugs: an emerging concern. *Medical Mycology*, v. 59, n. 3, p. 234–242, 2021.
- SILVA, J. N. et al. *In vitro* resistance of *Sporothrix brasiliensis* to itraconazole associated with therapeutic failure in sporotrichosis. *Medical Mycology*, v. 58, n. 3, p. 356–360, 2020.
- SILVA, M. B. T. et al. Urban *sporotrichosis*: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de saude publica*, v. 28, p. 1867–1880, 2012.
- SINGH, N.; VERMA, A.; MISHRA, A. Wheatgrass: an alternative therapeutic approach for fungal infections. *Journal of Pharmacy Research*, v. 9, n. 5, p. 321–324, 2015.
- SOLÓRZANO, O. T. et al. Evaluación de la actividad reepitelizante del *Triticum vulgare* en la cervicitis crônica erosiva. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. v.44, n.1, p.79-83, 2001.
- SOUZA, D. L. et al. Antifungal activity of natural products against *Candida* and *Aspergillus* species: a systematic review. *Mycoses*, v. 63, n. 3, p. 261–272, 2020.
- TILLMANN, M. T. et al. *Triticum aestivum* in open wound healing: a clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 6, p. 1757–1761, 2014.
- TILLMANN, M. T. et al. *Triticum aestivum* in open skin wounds: cytotoxicity and collagen histopathology. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 39, n. 4, p. 1547–1554, 2018.
- WALLER, S. B. et al. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian journal of microbiology*, v. 52, p. 73-80, 2021.
- WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and Drug Resistance*, v. 10, p. 249–259, 2017.

### **3.2 Artigo 2-**

**Potencial terapêutico: avaliando a eficácia da timomodulina e de uma formulação tópica cicatrizante no tratamento da esporotricose cutânea experimental causada por *Sporothrix brasiliensis* em modelo murino**

Martha Bravo Cruz Piñeiro, Vanice Rodrigues Poester, Melissa Orzechowski Xavier, Luiza da Gama Osório, Stefanie Bressan Waller Cristina Gevehr Fernandes, Sabrina de Oliveira Capella, Fábio Raphael Pascoti Bruhn, Márcia de Oliveira Nobre

Será submetido à revista *Mycoses*

## INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose mundial que resulta da implantação dos conídios do gênero *Sporothrix* [1]. No Brasil, a esporotricose causada por *Sporothrix brasiliensis* é reconhecida como um grave problema de saúde pública, com milhares de casos relatados nas últimas décadas, abrangendo todos os 26 estados brasileiros [2]. Além das fronteiras nacionais, países da América do Sul também tem notificado casos de transmissão felina de *S. brasiliensis*, evidenciando seu potencial epidêmico [3-5]. Adicionalmente, nos últimos anos, foram descritos casos de esporotricose humana causa por *S. brasiliensis* no Reino Unido, transmitida por um gato importado do Brasil [6,7].

Identificada como a espécie mais virulenta do complexo, *S. brasiliensis*, é o principal agente etiológico da esporotricose felina e está associado a infecções de animais e transmissão zoonótica [8-10]. O aumento na prevalência da doença é devido a muitos fatores, incluindo a virulência do patógeno, dificuldade para tratar esta micose, período terapêutico, potencial zoonótico e o grande número de gatos não domiciliados e semidomiciliados que são afetados por este infecção fúngica [11].

Os gatos domésticos são altamente suscetíveis à esporotricose, desenvolvendo lesões múltiplas, que apresentam uma grande quantidade de células leveduriformes [12-14] e abrigam o fungo nas garras e na cavidade oral [13, 15-16], o que os distinguem de outras espécies e os caracterizam como notável fonte de infecção [18-20]. Uma vez que, inocula diretamente células de leveduras, que é mais virulenta do que a forma de micélio, representando uma forma bem-sucedida de dispersão da doença [8, 21, 22]. Consequentemente, a falta de políticas pública suficientes e medidas preventivas para esta doença [1, 23-26], juntamente com a dificuldade no tratamento dos gatos infectados, ocasiona nessa espécie as principais vítimas da esporotricose e atuantes como vetores da transmissão fúngica intra e interespécie [24, 25, 27, 28]. Assim, a cura de gatos com esporotricose é fundamental para controlar a doença em áreas hiperendêmicas [23].

A esporotricose tem como tratamento padrão os antifúngicos, e para cães e gatos o itraconazol é recomendado como primeira opção [1, 28, 30-33]. Entretanto, muitos casos são comprovadamente refratários ao antifúngico convencional, assim é crescente o número de casos com falhas terapêuticas. Vários fatores podem comprometer a cura clínica, como escolha do medicamento e doses terapêuticas [34], a administração terapêutica sendo fornecida conforme prescrito pelo veterinário [35], susceptibilidade antifúngica [36-38], entre outros. A falha do tratamento associada à baixa susceptibilidade de *S. brasiliensis* a itraconazol tem sido descrita

em estudos recentes que demonstraram resistência de *S. brasiliensis* frente a diferentes marcas comerciais e compostos [39], a resistência *in vitro* de *S. brasiliensis* correlacionado com falha terapêutica *in vivo* [40].

Assim, reafirma a necessidade de rever as alternativas dentro do compêndio farmacológico e formas de tratamento. Dentre essas, pode-se citar a associação de estimulantes do sistema imunológico com antifúngicos tradicionais como promissoras [41-42], considerando o papel da imunidade celular e da modulação da inflamação granulomatosa, fármacos que auxiliem a resposta imune podem ser benéficos para esses pacientes. A timomodulina é um extrato tímico que promove a modulação de linfócitos T e B e contribui para ação de vários tipos de células de defesa como neutrófilos, linfócitos e macrófagos, necessárias para o controle de micoses [43-44]. Ainda são escassos os estudos clínicos controlados avaliando a eficácia de imunomoduladores, sendo esse, um tópico em constante discussão na medicina felina [45]. Entretanto, pesquisas previamente realizadas apontam que o uso de timomodulina como terapia adjuvante para menor tempo de remissão dos sinais clínicos extracutâneos, melhora o prognóstico e sobrevida de gatos com esporotricose cutânea disseminada num estudo prospectivo [41].

Além disso, estudos anteriores determinaram a ação cicatrizante de duas formulações com ativos de extratos vegetais de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* (registro de solicitação de Patente junto ao INPI nº BR 10 2018 06970) para uso em feridas cutâneas abertas de pequenos animais. O potencial cicatrizante destes ativos foi estabelecido separadamente e sua ação conjugada comprovada em estudos pré-clínicos e clínicos no público-alvo., evidenciou-se que as formulações proporcionaram uma melhor circulação no local lesionado, acompanhada pelo aumento do infiltrado inflamatório, o que possibilita a ação de células de defesa do organismo limpando o local e o desenvolvimento de intensa rede de fibrina resultando numa barreira protetora local, principalmente para lesões cutâneas extensas com risco de contaminação. Além disso, possibilitaram uma maior formação e organização das fibras colágenas em menor tempo de tratamento no processo cicatricial, acelerando a fase de maturação da lesão e tornando a cicatriz mais resistente e elástica. Em caninos, foi observada a aceleração do processo cicatricial, otimizando o tratamento e alcançando a cura clínica em um intervalo de tempo reduzido [46-48].

Para que se possa propor a utilização de novos tratamentos em felinos com esporotricose é necessário, primeiramente, a realização de estudos pré-clínicos, com esporotricose induzida, garantindo a ação dos produtos no combate direto ao agente etiológico e, também, sua

efetividade no organismo animal em estudos experimentais. Somente após a realização destes estudos, observando resultados promissores e seguros, é possível a realização dos estudos *in vivo*, em espécie alvo. Assim, considerando o problema de saúde pública, além, da dificuldade na terapêutica de felinos, é evidente a necessidade de avaliar tratamentos que possam melhorar a resposta imunológica como adjuvantes na esporotricose felina. Dessa forma, o objetivo foi avaliar a ação da timomodulina das formulações tópicas como adjuvantes terapêuticos ao tratamento convencional da esporotricose cutânea experimental por *S. brasiliensis* em modelo murino.

## MÉTODOS

### Preparação do inóculo

O inóculo fúngico foi preparado a partir de um isolado clínico de *S. brasiliensis* (M1078) proveniente de esporotricose cutânea de felino doméstico com caracterização molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) espécie específica [50]. O isolado cedido pelo Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Rio Grande (FAMED-FURG), Brasil. O isolado fúngico foi passado por ratos norvergicus (*Rattus rattus*), albino, linhagem *Wistar* para garantir virulência e então reisolada. Para a obtenção do inóculo fúngico, esse isolado foi cultivado em caldo de infusão de cérebro-coração (BHI) (Kasvi®, São José dos Pinhais, PR, Brasil) a 37°C durante 10 dias e mantido em agitador rotativo com agitação constante (150 rpm) para obtenção da forma leveduriforme do fungo com posterior padronização o inóculo em  $10^7/100\mu\text{L}$  células fúngicas por espectrofotômetro [51].

### Indução da esporotricose experimental

A esporotricose experimental foi induzida em ratos norvergicus (*Rattus rattus*), albinos, linhagem *Wistar*, com idade inicial de 60 dias, machos. Os animais foram mantidos em condições controladas de umidade, temperatura e ciclo claro e escuro de 12h/12h, alimentados com dieta comercial conforme o peso corporal e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Para o desenvolvimento da esporotricose experimental, esses animais foram previamente anestesiados com associação de xilazina (10mg/kg) e cetamina (100mg/kg) por via intraperitoneal e posterior inoculação de 0,2ml do inóculo já descrito anteriormente pela via

subcutânea nos coxins plantares dos membros posteriores, essa dose previamente foi testada por um estudo piloto realizado pelo grupo.

### **Desenho experimental**

O tratamento começou após 10 dias da inoculação de *S. brasiliensis*, foi confirmada o desenvolvimento da esporotricose experimental, com a presença de nódulos e crostas no ponto de inoculação. Os animais foram alocados aleatoriamente em oito grupos (n=30/grupo) e iniciado os tratamentos uma vez ao dia conforme o grupo. Foram estudados oito grupos, seis animais por grupo: GF1, tratado com formulação tópica LCFT2001; GF2, tratado com formulação tópica LCFT2002; GT, tratado com timomodulina 4mg/kg; GIT, tratado com timomodulina 4mg/kg mais itraconazol 10mg/kg; GITF1, tratado com itraconazol 10mg/kg mais timomodulina 4mg/kg e formulação tópica LCFT2001; GITF2, tratado com itraconazol 10mg/kg mais timomodulina 4mg/kg e formulação tópica LCFT2002; GN, controle (não tratado) e GI, tratado com itraconazol 10mg/kg.

As drogas usadas neste estudo incluíram itraconazol (EMS) e timomodulina xarope (Leucogen®). A suspensão de itraconazol foi obtida através da maceração e mistura com água destilada estéril do conteúdo da apresentação comercial do medicamento, homogeneizada antes da administração oral [55]. A administração dos fármacos e diluentes foi realizada uma vez ao dia, pela via oral com o auxílio de uma sonda orogástrica por gavagem, a dose 10mg/kg. As lesões foram tratadas por aplicação tópica de 0,1mL dos tratamentos (LCFT 2001/ LCFT 2002/ Solução fisiológica) utilizando aplicador e espátula para melhor administração dos produtos, após aplicação foi realizado curativo com gaze e fita microporosa para manter o creme nas feridas, esse curativo foi refeito diariamente.

Aos quatro, 11, 18, 30 e 42 dias, seis animais de cada grupo foram eutanasiados (conforme anexo da Resolução Normativa nº 37, de janeiro de 2018), sob dose de anestésico inalatório em fluxo contínuo isoflurano, para as posteriores avaliações. Previamente a eutanásia, foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca para avaliação do hematócrito e dos leucócitos totais.

### **Avaliação clínica**

A avaliação clínica foi realizada em cinco períodos, 4, 7, 11, 18, 30 e 42 dias, quando os animais foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros clínicos: edema, eritema, nódulos, úlceras, exsudatos, crostas nos pontos de inoculação de cada animal, pelo mesmo avaliador a cega em todas as avaliações. Esses parâmetros foram atribuídos escores quantitativo conforme

a gravidade de cada sinal clínico, o que variou edema (0 a 10); eritema e crosta (0 a 7); nódulo, úlcera e exsudato (0 a 4). Também, foi observado pelo avaliador a se havia presença/ausência (escore 1 ou 0, respectivamente) de lesões de esporotricose em outras áreas corpóreas como patas anteriores, testículo, cauda, dorso. Desta forma, foi realizado um somatório dos escores dos parâmetros clínicos avaliados de cada animal, após realização da mediana de cada grupo em seu devido tempo de avaliação. Durante todo período experimental foi avaliado a condição clínica do animal como desidratação, piloereção, apatia, perda de peso e agressividade, que indicasse sofrimento, se houvesse algum caso os animais seriam imediatamente eutanasiados.

### **Avaliação micológica**

Para estimar a carga fúngica do ponto de inoculação, foi realizada a contagem de Unidade Formadora de Colônias (UFC) de *S. brasiliensis*. A amostra (coxim plantar direito) foi coletada assepticamente durante necropsia, pesada e submetida a homogeneização mecânica com água destilada estéril (10ml). Posteriormente foi filtrado em camada dupla de gaze estéril. O filtrado (100µl) foi cultivado em diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) pela técnica do espalhamento sobre meio de cultura (duplicata), Ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, incubados a 25°C durante seis dias quando foi realizada identificação e a contagem de UFCs das três diluições, em capela em fluxo laminar, e após calculada a média final determinando as unidades de formação de colônias por grama de tecido.

As amostras de vísceras (fígado, baço, testículo e pulmão) foram cultivadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, incubados a 25°C e 37°C durante seis dias para a identificação macro e micro morfológicos das colônias, quando ocorreu o retroisolamento do *S. brasiliensis*.

### **Avaliação histopatológica**

As amostras do coxim plantar esquerdo coletados em necropsia foram utilizados para análise histopatológica, foram fixados em formaldeído 10% e incluídos em parafina, processados e corados por Hematoxilina-eosina (H&E), Ácido Periódico de Shiff (PAS) e Metenamina de Prata de Grocott (Grocott).

As lâminas coradas com HE foram utilizadas para classificar as lesões do tecido e infiltrações celulares. A inflamação foi classificada quanto ao tipo, em piogranuloma, granuloma e abscesso; quanto a distribuição se difusa, focal ou multifocal; quanto a localização epiderme, derme superficial, derme profunda e hipoderme; quanto a presença e a predominância das células inflamatórias como macrófagos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, células

epiteloides e células gigantes, assim conforme, a quantidade foi determinados os seguintes escores: ausente (0), escasso (1), moderado (2) ou intensa (3). A fibrose foi avaliada a quantidade é esse através de escores se ausente (0), escassa (1), moderada (2) ou intensa (3); a maturidade da fibrose foi classificada em madura ou imatura; e a presença ou não de epiteliação. As lâminas coradas com PAS e Grocott foram utilizadas para melhor identificação das estruturas fúngicas. A quantidade de estruturas fúngicas foi feita em escores sendo considerados ausente (0), escassa (1), moderada (2) ou intensa (3).

### **Análise estatística**

Para a análise de variação dos dados paramétricos foi realizada teste de ANOVA para dois fatores (hematócrito, leucócitos totais, UFC/g) e a análise da variação dos dados não paramétricos (sinais inflamatórios e histopatologia) foram realizados utilizando o teste de Kruskal-Wallis, os valores  $p<0,05$  foram considerados significativos.

### **Declaração de ética.**

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA/UFPel; Número da Autorização: 3074-2018). Este estudo foi realizado em estrita conformidade com a lei brasileira número 11.794 de 2008, que regulamenta o cuidado e o uso de animais no ensino e na pesquisa no Brasil.

## **RESULTADOS**

### **Avaliação clínica**

Todos os grupos apresentaram redução dos somatórios dos escores dos parâmetros clínicos no decorrer do período experimental. Os somatórios dos escores dos parâmetros clínicos tiveram diferença do controle negativo (não tratado) e com os grupos tratados com as formulações tópicas, GIF2 ( $p=0,018$ ), GITF1 ( $p=0,004$ ) e GTF2 ( $p<0,001$ ). O controle negativo (GCN) teve um somatório considerável só a partir dos 18 dias e no final do experimento manteve mesmo valor comparada aos outros grupos no final do período experimental. Também, o grupo GI diferiu estatisticamente dos mesmos grupos com as formulações tópicas, GIF2 ( $p=0,018$ ), GITF1 ( $p=0,004$ ) e GITF2 ( $p<0,001$ ). Os grupos GI e controle negativo comportaram de forma semelhante, com baixos valores de somatório dos escores dos parâmetros clínicos, enquanto os grupos com formulações (GIF2, GITF1 e GITF2) apresentaram os maiores somatórios dos escores principalmente durante o início do experimento. O GF1 se

comportou diferente dos outros grupos de formulações tópicas, havendo um retardo no aumento dos seus sinais inflamatórios, que posteriormente aumentou consideravelmente em comparação aos outros grupos atingindo seu pico aos 18 dias e decrescendo de forma abrupta atingidos valores menores das formulações no final do período experimental (Figura 1).

Entre os grupos com timomodulina, o grupo GIT diferiu estatisticamente dos grupos com formulações GITF1 ( $p=0,018$ ) e GITF2 ( $p<0,001$ ), uma vez que os grupos com formulações apresentaram maiores valores de sinais clínicos inflamatórios. Demonstrando que ação das formulações tópicas associadas ao imunomodulador potencializa os sinais inflamatórios. Ademais, o grupo GT também diferiu estatisticamente do grupo GITF2 ( $p=0,015$ ). O GT teve um somatório elevado nos dias 11, 18 e 30 dias de avaliação tendo seu pico aos 30 dias, contudo aos 42 dias seus parâmetros clínicos foram menores quando comparado aos demais grupos. As formulações dos grupos com uso de LCFT 2002 (GF2, GITF2) apresentaram somatório dos sinais inflamatórios geralmente maiores e mais constantes que com uso de LCFT2001 (GF1 e GITF1). O GITF2 apresentando maior somatório em comparação a todos grupos no final do período experimental.

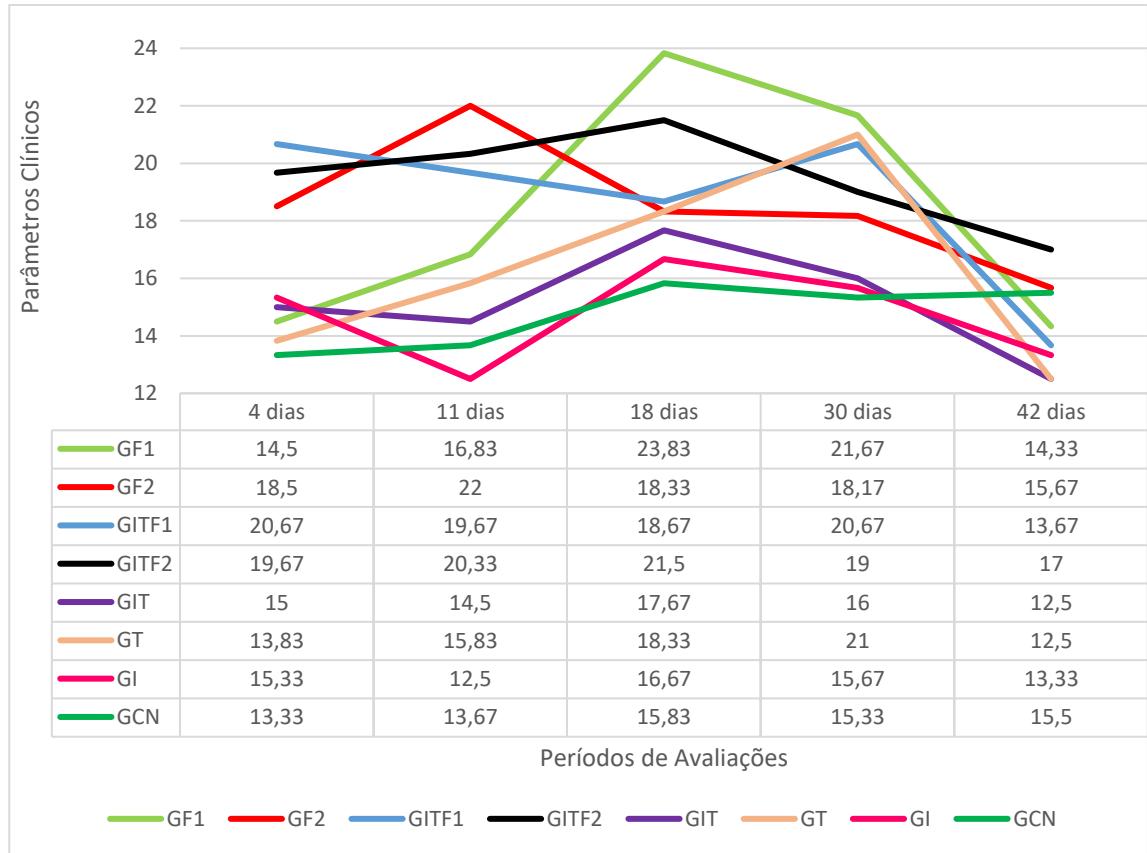


Figura 1- Os valores dos somatórios demonstrados pelo uso de formulação tópica LCFT2001 (GF1); LCFT2002 (GF2); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2001 (GITF1); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2002 (GITF2); da associação de timomodulina e itraconazol (GIT); timomodulina (GT); itraconazol (GI) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GCN) nos períodos de avaliações de quatro, 11, 18, 30 e 42 dias.

### Avaliação do hematócrito e leucócitos totais

Nenhum dos animais apresentou sinais e valores de hematócrito referente a anemia, logo todos apresentaram valores alto de hematócrito variando de 33 a 52% de hematócrito. A média do hematócrito foi de 42%. O controle negativo, exceto no aos 4 dias de tratamento, apresentou valores maiores de leucócitos totais diferenciando estatisticamente do GI ( $p=0,045$ ). Os grupos somente com formulações, GF1 e GF2 demonstraram diferença estatística frente a todos demais grupos, apresentando valores maiores de leucócitos totais, GITF1 ( $p=0,007$ ), GTF2 ( $p=0,010$ ), GIT ( $p=0,007$ ), GT ( $p=0,044$ ), GI ( $p<0,001$ ), GCN ( $p=0,013$ ). O grupo somente timomodulina GT também diferiu estatisticamente do grupo GI ( $p=0,01$ ) e GCN ( $p=0,045$ ) (Figura 2).

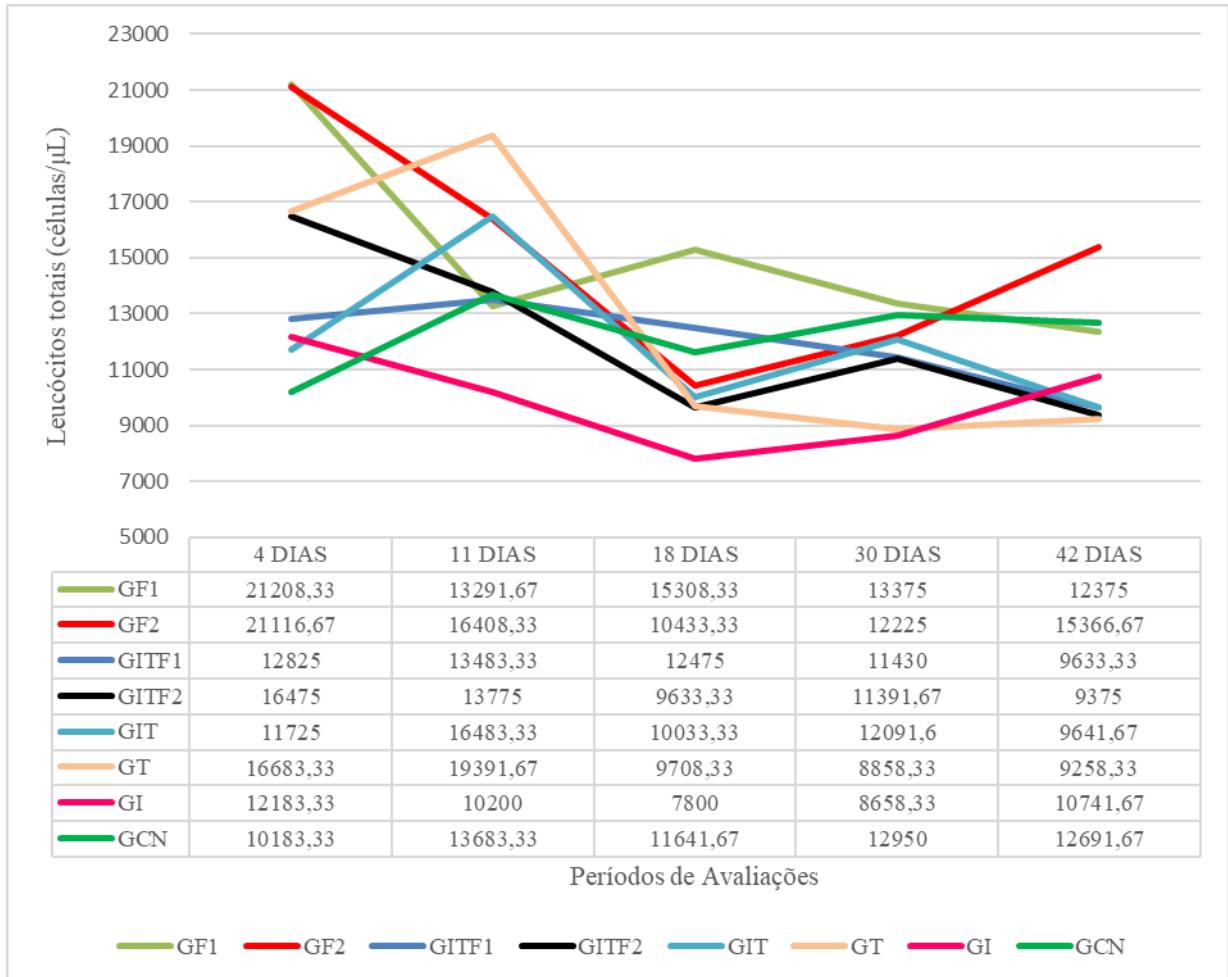


Figura 2. Resultados dos valores de leucócitos totais (células/ $\mu$ L) do sangue periférico dos animais, demonstrados pelo uso de formulação tópica LCFT2001 (GF1); LCFT2002 (GF2); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2001 (GITF1); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2002 (GITF2); da associação de timomodulina e itraconazol (GIT); timomodulina (GT); itraconazol (GI) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GCN) nos períodos de avaliações de quatro, 11, 18, 30 e 42 dias.

### Avaliação micológica

Em relação ao retroisolamento do *S. brasiliensis* a partir dos órgãos dos animais estudados, todos os grupos aos quatro dias de tratamento já apresentavam disseminação do fungo em fígados, baços, pulmões e testículos sem diferença significativa (Figura 2). Essa disseminação na maioria dos animais foi mantida até os 18 dias, mas aos 18 dias os grupos GITF2 e GCP apresentaram diminuição de animais que apresentaram disseminação do fungo

para órgãos. Já aos 30 dias todos os grupos diminuíram o número de animais e órgãos que retroisolaram o fungo, exceto o GCN que manteve disseminação em todos os órgãos

Na avaliação micológica, do ponto de inoculação, todos grupos, até o grupo não tratado (GCN) tiveram diminuição dos UFC/g no decorrer do período experimental (Tabela 1). Os grupos GITF1, GITF2, GIT apresentaram menores valores ao final do período de avaliação comparado com o restante dos tratamentos, incluindo o GI. No final do período experimental os grupos de itraconazol com terapia adjuvante (GIT, GITF1 e GITF2) apresentam valores menores de UFC/g comparados aos grupos sem itraconazol (GF1, GF2, GT), grupo somente itraconazol (GI) e controle negativo (GCN).

Quando observado os valores de UFC/g em todo período experimental o GIT, GITF1 e GITF foram significativamente menores que os GT ( $p=0,009$ ) e o GCN ( $p=0,014$ ), e comportou-se em quantidade fúngica semelhante ao GI e aos 42 dias demonstrou menor carga fúngica comparado ao GI. O GT aos quatro dias apresentou a maior carga fúngica quando comparada aos outros grupos, aos 30 dias o grupo GT apresentou valor alto de UFC/g diferindo estatisticamente do GIT, GITF1, GF1 e GITF2 ( $p=0,035$ ) e do GI ( $p=0,008$ ). O GI nos quatro dias apresentou carga fúngica semelhante ao GCN, mas a partir dos 11 dias começou a apresentar UFC/g menor que GCN até final do período experimental, diferindo estatisticamente aos 18 dias ( $p=0,049$ ) e aos 30 dias ( $p=0,043$ ). Os grupos somente de formulações tópicas apresentaram valores altos similares ao GT e GCN (Tabela 3).

Tabela 1. Resultados dos valores de UFC/g de *Sporothrix brasiliensis* no ponto de inoculação, demonstrados pelo uso de formulação tópica LCFT2001 (GF1); LCFT2002 (GF2); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2001 (GITF1); da associação de timomodulina, itraconazol e LCFT2002 (GITF2); da associação de timomodulina e itraconazol (GIT); timomodulina (GT); itraconazol (GCP) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GCN) nos períodos de avaliações de quatro, 11, 18, 30 e 42 dias.

<b>Grupos</b>	<b>Períodos de avaliação</b>				
	<b>4 dias</b>	<b>11 dias</b>	<b>18 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>42 dias</b>
GF1	$4,6 \times 10^7$ A	$2,4 \times 10^7$ B	$1,6 \times 10^7$ AB	$8,7 \times 10^6$ AB	$4,1 \times 10^5$ B
GF2	$4,8 \times 10^7$ A	$1,6 \times 10^7$ AB	$1,0 \times 10^7$ AB	$7,6 \times 10^7$ C	$1,9 \times 10^5$ AB
GITF1	$9,5 \times 10^7$ A	$1,0 \times 10^7$ AB	$7,3 \times 10^6$ A	$3,6 \times 10^6$ A	$6,0 \times 10^4$ A
GITF2	$9,3 \times 10^7$ A	$2,3 \times 10^6$ A	$1,2 \times 10^7$ AB	$4,8 \times 10^6$ A	$7,6 \times 10^4$ A
GIT	$2,1 \times 10^7$ A	$4,0 \times 10^6$ A	$1,0 \times 10^7$ AB	$7,7 \times 10^6$ AB	$7,3 \times 10^4$ A
GT	$1,1 \times 10^8$ A	$1,2 \times 10^7$ AB	$2,7 \times 10^7$ AB	$2,2 \times 10^7$ C	$1,1 \times 10^5$ AB
GCP	$8,3 \times 10^7$ A	$5,1 \times 10^6$ AB	$5,5 \times 10^6$ A	$3,3 \times 10^6$ A	$6,5 \times 10^5$ B
GCN	$8,7 \times 10^7$ A	$2,1 \times 10^7$ B	$3,5 \times 10^7$ B	$1,7 \times 10^7$ BC	$8,0 \times 10^5$ B

As diferentes letras mostram diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) por ANOVA para dois fatores.

### Estudo histopatológico

A lesão de esporotricose no ponto de inoculação de todos os grupos em todos os períodos de avaliação foram piogranulomatosa com distribuição multifocal. No início do período experimental, quatro dias de tratamento, os grupos apresentavam comprometimento em derme profunda, exceto o controle negativo que apresentava comprometimento da epiderme a derme profunda. Em relação ao infiltrado inflamatório os grupos em que foi administrado itraconazol (GITF1, GITF2, GIT, GI) apresentaram exacerbado macrófago, enquanto os outros grupos apresentaram moderada quantidade de macrófago. Os grupos com associação de itraconazol e timomodulina (GITF1, GITF2, GIT) apresentaram moderada quantidade de linfócitos e escassa células gigantes, enquanto os outros grupos apresentavam escasso quantidade de linfócitos e ausente células gigantes. Os neutrófilos estavam presentes em todos de forma exacerbada e as células epiteloides na quantidade moderada. A fibrose era imatura em todos os grupos numa quantidade moderada.

Aos 11 dias o grupo GI também começou apresentar lesão desde a epiderme até a derme profunda como o grupo controle (GCN) e o GT da derme superficial a profunda. O infiltrado inflamatório predominou nos animais com quantidade moderada de macrófago, exacerbada

quantidade de neutrófilos e escassa quantidade de células gigantes. Os grupos com itraconazol (GITF1, GITF2, GIT, GI) e controle negativo (GCN) demonstrando quantidade escassa de linfócitos e moderada células gigantes, enquanto o grupo GT apresentando moderada quantidade de linfócitos e escassa células gigantes. A fibrose tornou-se madura no grupo GITF2. Os grupos (GITF1, GITF2 e GIT) não apresentando células fúngicas enquanto os outros grupos quantidade moderada de leveduras.

Aos 18 dias todos começaram apresentar comprometimento desde a epiderme até a derme profunda apresentando quantidade moderada de macrófagos, exacerbado neutrófilos e escasso células gigantes. Os grupos GF1, GF2, GT e GCN diferindo dos demais com moderadas células epitelioides e escassos linfócitos, os outros grupos com escassas células epitelioides e moderado linfócitos Assim como, os grupos (GF1, GF2 e GT) apresentaram quantidade moderada de células fúngicas, os grupos GI, GCN apresentaram escassa células fúngicas enquanto os grupos com GITF1, GITF2 e GIT não apresentaram células fúngicas.

Aos 30 dias os grupos GIT, GITF1 e GITF2 o comprometimento, no ponto de inoculação, predominou somente na derme profunda, enquanto os outros grupos continuaram desde a epiderme até derme profunda. O infiltrado inflamatório dos grupos foi moderado em relação a quantidade de macrófagos, escasso para linfócitos, exacerbado para neutrófilos e escasso células epitelioides, diferenciando do grupo GI que apresentou exacerbado para macrófago e moderado para células epitelioides. Nas amostras dos grupos GITF1, GITF2 e GIT não houve presença de células fúngicas, os demais grupos apresentaram escassa quantidade de células fúngicas.

Aos 42 dias experimentais foi observado em todos os grupos, infiltrado com quantidade moderada de macrófagos e escassa quantidade de linfócitos. A quantidade de neutrófilos estava exacerbada na maioria dos grupos (GF1, GF2, GT, GI e GCN), exceto nos grupos associação itraconazol e timomodulina (GIT, GITF1, GITF2) que apresentaram quantidade moderada de neutrófilos. A quantidade de células epitelioides foi escassa, exceto no grupo controle (GCN) que foi moderada. A quantidade de células gigantes FOI escassa nos grupos com itraconazol (GITF1, GITF2,GIT,GI) e ausente nos grupos sem uso de itraconazol (GT,GF1, GF2). A fibrose diminui em todos os grupos para escasso, exceto no grupo GI que perpetuou a fibrose em quantidade moderada. As fibroses apresentavam imaturas (GF1,GF2,GT, GCN), exceto nos grupos associação de itraconazol e timomodulina (GITF1, GITF2, GIT). Não havia células

fúngicas nos grupos GITF1, GITF2, GIT, enquanto no outros (GF1, GF2, GT, GI, GCN) havia uma escassa quantidade.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que os extratos associados, *in vitro*, não possuem atividade antifúngica, assim como a associação deles ao itraconazol. No entanto, já foi demonstrado ação sinérgica dos extratos em estudos *in vivo*, com efeito pró-inflamatório, indutor de angiogênese e estimulante de fibroplasia, o que possivelmente interfira positivamente no potencial terapêutico de ação cicatrizante na associação desses extratos [47]. Dessa forma, podendo agir como adjuvante ao tratamento da esporotricose, mesmo sem ação antifúngica direta, auxiliando no processo cicatricial das lesões e reduzindo o tempo de tratamento.

Na avaliação clínica e do UFC do estudo *in vivo*, observou-se que diferenças significativas dos grupos que receberam itraconazol, timomodulina e as formulações tópica (GITF1 e GITF2) dos demais grupos (GIT, GCN e GI), demonstrando ação combinada da timomodulina com as formulações permite reação imune sistêmica ao mesmo tempo que promove uma ação pró inflamatória local. Isso leva a um tratamento otimizado com uma maior resposta inflamatória desde o início do tratamento acelerando-o. Uma vez que, a timomodulina desempenha como mecanismo de ação a imunomodulação, potencializando o sistema imune, modulando linfócitos T e B, assim como, apropriado funcionamento de células de defesa contra infecções fúngicas como neutrófilos e macrófagos [43].

Corroborando com isso, na avaliação histológica dos grupos da associação de itraconazol e timomodulina (GIT, GITF1 e GITF2) nos quatro dias de tratamento demonstraram maior quantidade de linfócitos em comparação aos outros grupos e os grupos com itraconazol, a quantidade de linfócitos é inversamente proporcional a quantidade de carga fúngica. Ademais, aos 11 dias já não apresentando células fúngicas nas lâminas histológicas. O tempo de cicatrização da lesão é correlacionado positivamente com a carga fúngica [54], assim os grupos que associam itraconazol e timomodulina haverá uma cicatrização mais rápida que o restante dos grupos.

A resposta do GITF2 revelou-se mais eficaz em comparação com o GITF1, pois diferiu significativamente do grupo somente com timomodulina (GT). Esta formulação incorpora o extrato etanólico de trigo em vez do extrato aquoso de trigo que compõe o GITF1. O extrato

etanólico de trigo possui compostos diferenciados, o que expressa uma ação esfoliante promovendo a descamação da pele e removendo o tecido desvitalizado. Além disso, apresenta antioxidantes que impedem a degradação de fibras estruturais como colágeno e elastina, auxiliando na regeneração do tecido epitelial, o que permite uma melhor ação cicatricial [47].

A distinção do grupo GF1 e os demais grupos com formulações pode ser atribuída à variação na composição das formulações. Enquanto o LCFT2001 contém extrato oleoso de urucum e extrato aquoso de trigo, o LCFT2002 apresenta extrato oleoso de urucum e extrato etanólico de trigo. O extrato oleoso utilizado exibe uma ação pró inflamatório devido à quimiotaxia induzida dos ácidos graxos presentes [46]. Os extratos de trigo também têm uma ação pró-inflamatória aumentando a migração de fibroblastos para o local lesado [48, 53]. No entanto, a fórmula LCFT2002 já demonstrou maior índice de infiltrado inflamatório em comparação ao LCFT2001 [47] na histologia, e uma fibrose madura mais precoce que os outros grupos. Segundo De Souza et al [54] a presença de fibrose dérmica está relacionada a cura clínica.

Embora não tenha diferença estatística o GIT na clínica, na análise, do UFC/g observou-se uma disparidade em relação aos grupos controle (GI e GCN), evidenciando uma ação crucial no combate ao fungo. Assim, a associação do itraconazol com imunomodulador obteve uma resolução mais rápida no final do período experimental sugerindo um sinergismo entre os fármacos, onde o itraconazol age na eliminação direta do agente fúngico *S. brasiliensis*. O mecanismo de ação do itraconazol baseia-se na capacidade do fármaco bloquear a síntese do ergosterol, um componente vital da membrana da célula fúngica, isso ocorre através da inibição seletiva da enzima 14- $\alpha$ -demetilase, dependendo do citocromo P-450, que participa da conversão de lanosterol a ergosterol. Consequentemente, há um acúmulo de uma série de precursores metilados com a concomitante diminuição, ou mesmo a ausência, do produto da via biossintética. Este bloqueio acarreta o aumento da permeabilidade da membrana celular, desencadeando alterações morfológicas que resultam em inibição do crescimento fúngico e necrose celular. A atividade é primeiramente fungistática, podendo ser fungicida em doses elevadas frente a determinadas espécies fúngicas [55-57]. Enquanto a timomodulina atua estimulando o organismo no combate inespecífico da lesão provocada pelo fungo.

Os tratamentos somente com formulações (GF1 e GF2) demonstraram uma diferença significativa, principalmente o GF2, clinicamente. No entanto, na UFC/g, observou-se que eles apresentaram semelhança com o grupo de controle negativo. Essa variação pode indicar que

essas formulações atuaram no processo inflamatório local auxiliando na reparação tecidual, na limpeza do tecido evitando contaminações secundárias e não agindo na inibição do crescimento fúngico por não haver a presença do itraconazol. Corroborando com isso, grupos somente com formulações, GF1 e GF2 demonstraram diferença estatística frente a todos demais grupos, apresentando valores maiores de leucócitos totais, demonstrando uma demanda sistêmica por não conter a infecção. As formulações pela presença dos ácidos graxos presentes no ativo *B. orellana* L. estimulam a ação de mediadores quimiotáticos e a produção de fatores de crescimento, que promovem um efeito pró inflamatório [47]. Na histologia, os grupos sem itraconazol apresentaram mais tempo experimental de fibrose imatura, maior quantidade de células epitelioides e menor de linfócitos e de células gigantes.

Assim como, o grupo GT, mostrou uma resposta inflamatória alta a partir dos 11 dias de tratamento comparada aos demais grupos, contudo também apresentou altos valores de UFC/g quando comparada aos outros grupos, diferindo significativamente aos 30 dias de tratamento, mesmo momento em que observou-se pico de sinais clínicos inflamatórios. Logo, somente o imunomodulador atuou sobre o sistema imunitário sem o controle da carga parasitária, o que possivelmente tenham estimulado o fungo a aumentar sua multiplicação para debelar o sistema imune, como é descrito que ocorra para doenças virais [58-59]. Isso também é demonstrando nos valores de leucócitos totais, no qual os grupos sem itraconazol (GF1, GF2 e GT) apresentaram valores mais altos diferindo significativamente dos outros grupos, demonstrando uma demanda do sistema imune, sem controle da doença fúngica.

Assim, o presente estudo expõe que o tratamento à base de timomodulina, itraconazol e GITF2 demonstrou um desempenho superior devido a ação de sinergismo entre o itraconazol que age na eliminação da do agente fúngico *S. brasiliensis* enquanto a timomodulina atua estimulando o organismo no combate inespecífico da lesão provocada pelo fungo , já que modula células de defesa como neutrófilos e macrófagos ativados, que produzem óxido nítrico e seus metabólitos reativos de oxigênio que desempenham um papel importante na fagocitose e na eliminação de *Sporothrix* spp [58-60]. Enquanto a formulação com o extrato etanólico de trigo estimulam e aceleram a cicatrização das lesões [47], reduzindo assim o tempo necessário para o tratamento.

Conclui-se que o tratamento com adjuvantes, como a timomodulina e formulação tópica LCFT2002 otimiza o processo terapêutico. Essa otimização é resultante do aumento da resposta inflamatória sistêmica e local, por consequinte, potencializa a atividade antifúngica do

itraconazol, potencializando o processo cicatricial, destacando a importância da combinação das abordagens para uma terapia eficiente. Apesar, no ensaio *in vitro* as formulações tópicas não apresentam atividade fungicida frente a *S. brasiliensis*.

### **Agradecimento**

Gostaríamos de agradecer à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - código de financiamento 001, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) - código de financiamento 308152/2019-0, a FAPERGS (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) - código de financiamento 19/2551-0001904-1 e Universidade Federal de Pelotas pelo apoio financeiro as pesquisas e aos pesquisadores.

## REFERÊNCIAS

1. Gremião, I. D., Menezes, R. C., Schubach, T. M., Figueiredo, A. B., Cavalcanti, M. C., & Pereira, S. A. (2014). Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Sabouraudia*, 53(1), 15-21.
2. Rodrigues AM, Gonçalves SS, de Carvalho JA, Borba-Santos LP, Rozental S, de Camargo ZP. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. *J Fungi*. 2022;8(8):776. doi:10.3390/jof8080776
3. Duarte JMG, Acosta VRW, Viera PMLF, et al. Sporotrichosis transmitted by domestic cat. A family case report. *Del Nacional*. 2017;9(2):67-76. doi:10.18004/rdn2017.0009.02.067-076
4. Etchecopaz AN, Lanza N, Toscanini MA, et al. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. *J Mycol Med*. Published online 2019:100908. doi:10.1016/j.mycmed.2019.100908
5. Thomson P, González C, Blank O, et al. Sporotrichosis outbreak due to *Sporothrix brasiliensis* in domestic cats in magallanes, Chile: a ne-health-approach study. *J Fungi*. 2023;9(2):226. doi:10.3390/jof9020226.
6. Rachman R, Ligaj M, Chinthapalli S, Wani RS. Zoonotic acquisition of cutaneous *Sporothrix brasiliensis* infection in the UK. *BMJ Case Rep*. 2022;15(5):e248418. doi:10.1136/bcr-2021-248418
7. Barnacle JR, Chow YJ, Borman AM, et al. The first three reported cases of *Sporothrix brasiliensis* cat-transmitted sporotrichosis outside South America. *Med Mycol Case Rep*. 2023;39:14-17. doi:10.1016/j.mmcr.2022.12.004
8. Rodrigues, A. M., Bagagli, E., de Camargo, Z. P., & de Moraes Gimenes Bosco, S. (2014). *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in an armadillo's burrow. *Mycopathologia*, 177, 199-206.
9. Rodrigues, A. M., de Hoog, G. S., & de Camargo, Z. P. (2015). Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(12), e0004190.
10. Rodrigues, A. M., de Hoog, G. S., & de Camargo, Z. P. (2016). *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. *PLoS pathogens*, 12(7), e1005638.
11. Forlani, G. S., Brito, R. S. A. D., Salame, J. P., Gomes, A. R., Bruhn, F. R. P., Madrid, I. M., & Nobre, M. D. O. (2021). Thymomodulin in association with antifungal drugs in the therapy of cats with disseminated cutaneous sporotrichosis: a prospective study. *Ciência Rural*, 51, e20200311.

12. Miranda, L. H., Conceição-Silva, F., Quintella, L. P., Kuraiem, B. P., Pereira, S. A., & Schubach, T. M. (2013). Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(4), 425-432.
13. Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Oliveira Nobre M, Meireles MCA. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*. 2012;173:265-273. doi:doi: 10.1007/s11046-011-9509-4.
14. Schubach, T. M., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M. B., Figueiredo, F. B., Cuzzi, T., ... & Wanke, B. (2004). Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(10), 1623-1629.
15. Macêdo-Sales, P. A. D., Souto, S. R. L. D. S., Destefani, C. A., Lucena, R. P. D., Rocha, E. M. D. S. D., & Baptista, A. R. D. S. (2018). Laboratory diagnosis of feline sporotrichosis in samples from Rio de Janeiro State, Brazil: imprint cytopathology limitations/Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. *Rev Pan-Amaz Saúde*, 13-19.
16. Barros, M. B. D. L., Schubach, T. M. P., Gutierrez Galhardo, M. C., Schubach, A. D. O., Monteiro, P. C. F., Reis, R. S., ... & Valle, A. C. F. D. (2001). Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 777-779.
17. Nobre, M. D. O., Castro, A. P. D., Caetano, D., Souza, L. L., Meireles, M. C. A., & Ferreiro, L. (2001). Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. *Revista Iberoamericana de micología*, 18, 137-140;
18. Rodrigues, A. M., Della Terra, P. P., Gremião, I. D., Pereira, S. A., Orofino-Costa, R., & de Camargo, Z. P. (2020). The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*, 185(5), 813-842.
19. Fernandes, K. S. S., Coelho, A. L. J., Bezerra, L. L., & Barja-Fidalgo, C. (2000). Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology*, 101(4), 563-569.
20. Klein, B. S., & Tebbets, B. (2007). Dimorphism and virulence in fungi. *Current opinion in microbiology*, 10(4), 314-319.
21. Munhoz, L. S., Poester, V. R., Benelli, J. L., Melo, A. M., Trápaga, M. R., Nogueira, C. W., ... & Xavier, M. O. (2023). Effectiveness of diphenyl diselenide against experimental sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Medical Mycology*, 61(4), myad035.
22. Sanchotene KO, Madrid IM, Klafke GB, et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*. 2015;58(11):652-658.

doi:10.1111/myc.12414

23. Gremião, I. D. F., Miranda, L. H. M., Reis, E. G., Rodrigues, A. M., & Pereira, S. A. (2017). Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. *PLoS pathogens*, 13(1), e1006077.
24. Silva, G. M., Howes, J. C. F., Leal, C. A. S., Mesquita, E. P., Pedrosa, C. M., Oliveira, A. A. F., ... & Mota, R. A. (2018). Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, 1767-1771.
25. Barros, M. B. D. L., Schubach, A. D. O., do Valle, A. C. F., Galhardo, M. C. G., Conceição-Silva, F., Schubach, T. M. P., ... & Conceição, M. J. (2004). Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clinical Infectious Diseases*, 38(4), 529-535.
26. Gremião, I. D. F., Martins da Silva da Rocha, E., Montenegro, H., Carneiro, A. J. B., Xavier, M. O., de Farias, M. R., ... & Lopes-Bezerra, L. M. (2021). Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Brazilian journal of Microbiology*, 52, 107-124.
27. Pereira, S. A., Passos, S. R. L., Silva, J. N., Gremião, I. D. F., Figueiredo, F. B., Teixeira, J. L., ... & Schubach, T. M. P. (2010). Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Veterinary Record*, 166(10), 290-294.
28. Poester VR, Basso RP, Stevens DA, et al. Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*. *J fungi*. 2022;8(1). doi:10.3390/jof8010070
29. Rossow, J. A., Queiroz-Telles, F., Caceres, D. H., Beer, K. D., Jackson, B. R., Pereira, J. G., ... & Pereira, S. A. (2020). A one health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. *Journal of Fungi*, 6(4), 247.
30. Thompson, G. R., Le, T., Chindamporn, A., Kauffman, C. A., Alastruey-Izquierdo, A., Ampel, N. M., ... & Pasqualotto, A. C. (2021). Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(12), e364-e374.
31. Kinnison, T., Guile, D., & May, S. A. (2015). Errors in veterinary practice: preliminary lessons for building better veterinary teams. *Veterinary Record*, 177(19), 492-492.
32. Sivén, M., Savolainen, S., Räntilä, S., Männikkö, S., Vainionpää, M., Airaksinen, S., ... & Juppo, A. M. (2017). Difficulties in administration of oral medication formulations to pet cats: an e-survey of cat owners. *Veterinary Record*, 180(10), 250-250.
33. Borba-Santos, L. P., Rodrigues, A. M., Gagini, T. B., Fernandes, G. F., Castro, R., de

- Camargo, Z. P., ... & Rozental, S. (2014). Susceptibility of *S porothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Sabouraudia*, 53(2), 178-188.
34. Brilhante, R. S. N., Rodrigues, A. M., Sidrim, J. J. C., Rocha, M. F. G., Pereira, S. A., Gremião, I. D. F., ... & de Camargo, Z. P. (2015). In vitro susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. *Sabouraudia*, 54(3), 275-279.
35. Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrillón MR, et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Med Mycol*. 2013;52(1):56-64. doi:10.3109/13693786.2013.818726
36. Waller, S. B., Ripoll, M. K., Madrid, I. M., Acunha, T., Cleff, M. B., Chaves, F. C., ... & Meireles, M. C. A. (2021). Susceptibility and resistance of *Sporothrix brasiliensis* to branded and compounded itraconazole formulations. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 155-162.
37. Nakasu CCT, Waller SB, Ripoll MK et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. *Brazilian J Microbiol*. 2021; 52: 163–171.
38. Forlani, G. S., Brito, R. S. A. D., Salame, J. P., Gomes, A. R., Bruhn, F. R. P., Madrid, I. M., & Nobre, M. D. O. (2021). Thymomodulin in association with antifungal drugs in the therapy of cats with disseminated cutaneous sporotrichosis: a prospective study. *Ciência Rural*, 51, e20200311.
39. ANDRADE, S. F. (2017). Manual de terapêutica veterinária: consulta rápida. Rio de Janeiro: Roca.
40. Forlani, G. S., Brito, R. S. A. D., Salame, J. P., Gomes, A. D. R., & Nobre, M. D. O. (2018). Esporotricose em um felino soropositivo para FeLV: relato de caso. *Clín. Vet.*, 58-68.
41. Zaine, L., Monti, M., Vasconcellos, R. S., & Carciofi, A. C. (2014). Immunomodulatory nutraceuticals with potential clinical use for dogs and cats. *Semina: Ciências Agrárias* (Londrina), 35(4 Suppl.), 2513-2529.
42. Capella, S.O., Krug, F., Tillmann, M. T., Vianna, R., Aranha, B. C., Chaves, F. C., ... & de Oliveira Nobre, M. (2020). Potencial terapêutico de Fármacos com ativos de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* no tratamento de lesões térmicas. *Research, Society and Development*, 9(3), 29.
43. Capella, S. O., Tillmann, M. T., Félix, A. O. C., Fontoura, E. G., Fernandes, C. G., Freitag, R. A., ... & Nobre, M. O. (2016). Therapeutic potential of *Bixa orellana* L. in skin wounds: a study in the rat model of open wound healing. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68, 104-112.
44. Tillmann, M. T., Felix, A. O. C., Mueller, E. N., Felix, S. R., Alves, G. H., Ramos, T. S., ... & Nobre, M. O. (2014). Uso de *Triticum aestivum* na cicatrização de feridas:

- um ensaio clínico, histopatológico e tensiométrico em coelhos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 66, 1757-1761.
45. Munhoz, L. S., Poester, V. R., Benelli, J. L., Melo, A. M., Trápaga, M. R., Nogueira, C. W., ... & Xavier, M. O. (2023). Effectiveness of diphenyl diselenide against experimental sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Medical Mycology*, 61(4), myad035.
  46. Della Terra, P. P., Rodrigues, A. M., Fernandes, G. F., Nishikaku, A. S., Burger, E., & de Camargo, Z. P. (2017). Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(8), e0005903.
  47. Rodrigues AM, Teixeira M de M, de Hoog GS, et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6):e2281. doi:10.1371/journal.pntd.0002281
  48. Danielli, L. J., Pippi, B., Duarte, J. A., Maciel, A. J., Lopes, W., Machado, M. M., ... & Apel, M. A. (2018). Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect in vitro with terbinafine and ciclopirox against dermatophytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(9), 1216-1227.
  49. Souza, D. W., Machado, T. S. D. L., Zoppa, A. L. D. V. D., Cruz, R. S. F., Gárague, A. P., & Silva, L. C. L. C. (2006). Ensaio da aplicação de creme à base de *Triticum vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Rev Bras Plantas Med*, 8(3), 9-13.
  50. de Souza, E. W., Borba, C. D. M., Pereira, S. A., Gremião, I. D. F., Langohr, I. M., Oliveira, M. M. E., ... & Menezes, R. C. (2018). Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Scientific reports*, 8(1), 9074.
  51. Jaham, C. D., Paradis, M., & Papich, M. G. (2000). Antifungal dermatologic agents: azoles and allylamines. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 22(6), 548-559.
  52. Farias, M.R., Giuffrida, R. Antifúngicos,in S. F. Andrade, Manual de terapêutica veterinária, ( São Paulo: Roca, 2016) 73-90
  53. Nobre, M. D. O., Nascente, P. D. S., Meireles, M. C., & Ferreiro, L. (2002). Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, 32, 175-184.
  54. Hiruma, M., Yamaji, K., Shimizu, T., Ohata, H., & Kukita, A. (1988). Ultrastructural study of tissue reaction of mice against *Sporothrix schenckii* infection. *Archives of dermatological research*, 280, S94-100.
  55. Peng-Cheng, L., Yoshiike, T., Yaguchi, H., & Ogawa, H. (1993). Histopathological studies of *Sporothrix schenckii*-inoculated mice: Possible functions of

- polymorphonuclear leukocytes in normal and immunocompromised (congenitally athymic nude) mice. *Mycopathologia*, 122, 89-93.
56. Kajiwara, H., Saito, M., Ohga, S., Uenotsuchi, T., & Yoshida, S. I. (2004). Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. *Infection and immunity*, 72(9), 5073-5079.

### **3.3 Artigo 3**

**Timomodulina e formulação tópica com ativos de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* potencializando a eficácia no tratamento da esporotricose felina em ensaio clínico em felinos naturalmente infectados.**

Martha Bravo Cruz Piñeiro, Vanice Rodrigues Poester, Melissa Orzechowski Xavier, Isabel Martins Madrid, Cristina Gevehr Fernandes, Sabrina de Oliveira Capella, Fabio Raphael Pascoti Bruhn, Márcia de Oliveira Nobre

Será submetido à revista Ciência Rural

1    **Timomodulina e formulação tópica com ativos de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum***  
2    **potencializando a eficácia no tratamento da esporotricose felina em ensaio clínico em**  
3    **felinos naturalmente infectados**

4    **Thymomodulin and topical formulation with extracts from *Bixa orellana* L. and**  
5    ***Triticum aestivum* enhancing efficacy in the treatment of feline sporotrichosis**

6    Martha Bravo Cruz Piñeiro<sup>1</sup>, Vanice Rodrigues Poester<sup>2</sup>, Melissa Orzechowski Xavier<sup>2</sup>, Isabel  
7    Martins Madrid<sup>3</sup>; Cristina Gevehr Fernandes<sup>1</sup>, Sabrina de Oliveira Capella<sup>1</sup>, Fabio Raphael  
8    Pascoti Bruhn<sup>1</sup>, Márcia de Oliveira Nobre<sup>1</sup>

9

10    **RESUMO**

11    A esporotricose é uma grave zoonose com epidemiologia global. Diferente do cenário mundial,  
12    no Brasil essa micose acomete principalmente felinos domésticos, que são principais  
13    transmissor para humanos e outros animais. Os gatos são altamente suscetíveis à esporotricose,  
14    desenvolvendo quadros graves e maior número de células leveduriformes nas lesões do que as  
15    demais espécies. Em felinos também há maior falha na resposta imune celular e terapêutica.  
16    Este estudo avaliou a eficácia do imunomodulador timomodulina e da formulação tópica com  
17    extrato de urucum e trigo como adjuvantes terapêuticos ao tratamento convencional da  
18    esporotricose felina. Foram estudados 27 felinos com diagnóstico de esporotricose, os quais  
19    foram classificados conforme estado geral, apresentação das lesões e *status* retroviral, divididos  
20    em grupos: GITF, animais tratados com itraconazol (ITZ), timomodulina e formulação tópica;  
21    GIT, tratados com ITZ e timomodulina; GIF, tratados com ITZ e formulação tópica, sendo um  
22    grupo controle positivo tratado somente com ITZ. Previamente, os animais foram avaliados  
23    durante o período experimental (60 dias) quanto ao desfecho clínico, redução da área das lesões,  
24    quantidade de células fúngicas por lesão na citologia, padrão inflamatória das lesões na

1 histologia. Os resultados demonstraram não haver diferenças estatísticas entre os grupos, no  
2 entanto, o uso da timomodulina e da formulação tópica demonstrou clinicamente uma redução  
3 em menor tempo de área da lesão e, consequentemente, na citologia menor carga fúngica nas  
4 lesões. Apesar disso, o uso da timomodulina combinada com itraconazol mostrou melhor  
5 desfecho clínico, sem nenhum caso de falha terapêutica. Histologicamente, os grupos com  
6 formulações apresentaram maior quantidade de células epitelioides e os grupos com  
7 timomodulina apresentaram maior quantidade de linfócitos com o tratamento. Ademais, os  
8 grupos com formulações apresentaram antes os outros grupos fibrose nas lesões. Conclui-se  
9 que a timomodulina e a formulação são eficientes como um composto adjuvante a terapia com  
10 itraconazol no tratamento da esporotricose felina, pois potencializa a atividade pró inflamatória  
11 acelerando o processo cicatricial.

12 **Palavras-chave:** cicatrização, gatos, resposta imune, terapia.

13

14 **ABSTRACT**

15 Sporotrichosis is a severe zoonosis with a global epidemiology. Unlike the worldwide scenario,  
16 in Brazil, this mycosis mainly affects domestic felines, which are the primary transmitters to  
17 humans and other animals. Cats are highly susceptible to sporotrichosis, developing severe  
18 cases with a higher number of yeast cells in the lesions compared to other species. In felines,  
19 there is also a greater failure in the cellular and therapeutic immune response. This study  
20 evaluated the efficacy of the immunomodulator thymomodulin and a topical formulation with  
21 annatto and wheat extract as therapeutic adjuvants to conventional treatment for feline  
22 sporotrichosis. Twenty-seven felines diagnosed with sporotrichosis were studied, classified  
23 according to general condition, lesion presentation, and retroviral status, and divided into  
24 groups: GITF, animals treated with itraconazole (ITZ), thymomodulin, and topical formulation;  
25 GIT, treated with ITZ and thymomodulin; GTF, treated with ITZ and topical formulation, with

1 a positive control group treated only with ITZ. During the 60-day experimental period, animals  
2 were evaluated for clinical outcomes, reduction in lesion area, quantity of fungal cells per lesion  
3 in cytology, and inflammatory pattern of lesions in histology. The results showed no statistical  
4 differences between groups; however, the use of thymomodulin and the topical formulation  
5 clinically demonstrated a quicker reduction in lesion area and, consequently, a lower fungal  
6 load in cytology. Despite this, the use of thymomodulin combined with itraconazole showed a  
7 better clinical outcome with no therapeutic failures. Histologically, the groups with  
8 formulations presented a higher quantity of epithelioid cells, and the groups with thymomodulin  
9 showed a higher quantity of lymphocytes with treatment. Additionally, the groups with  
10 formulations exhibited fibrosis in the lesions before the other groups. In conclusion,  
11 thymomodulin and the formulation are effective as adjuvants to itraconazole therapy in the  
12 treatment of feline sporotrichosis, as they enhance the pro-inflammatory activity, accelerating  
13 the healing process.

14 **Key words:** healing, cats, immune response, therapy

15

16

17

## 18 INTRODUCÃO

19 A esporotricose é uma grave zoonose de epidemiologia global que resulta da  
20 implantação dos conídios do gênero *Sporothrix* (GREMIÃO et al., 2015). O *Sporothrix*  
21 *brasiliensis* representa a espécie mais virulenta do complexo, emerge como o agente etiológico  
22 predominante da esporotricose felina. Esta espécie está associada a infecções de animais e à  
23 transmissão zoonótica. (RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; RODRIGUES  
24 et al., 2016). Atualmente, é reconhecido que o *S. brasiliensis* é a espécie responsável pela

1 hiperendemia da esporotricose transmitida por gatos no Brasil (SANCHOTENE et al., 2015;  
2 GREMIÃO et al., 2020; MOUSSA et al., 2017; ZHANG et al., 2015; XAVIER et al., 2023).  
3 Até 2018, o *S.brasiensis* estava aparentemente restrito ao Brasil, no entanto, nos últimos anos,  
4 essa espécie foi identificada em casos autóctones de outros países da América Latina, como  
5 Argentina, Paraguai e Chile, além de ter sido relatada na Europa e nos Estados Unidos da  
6 América, através de gatos importados do Brasil (GREMIÃO et al., 2020<sup>a</sup>; GARCIA et al., 2017;  
7 CÓRDOBA et al., 2018; ETCHECOPAZ et al., 2019; KAADAN et al., 2020; ETCHECOPAZ  
8 et al., 2021; BARNACLE et al., 2023; THOMSON et al., 2023; XAVIER et al., 2023)

9 A crescente prevalência da esporotricose é atribuída à virulência do patógeno,  
10 dificuldades no tratamento, período terapêutico, potencial zoonótico e o grande número de gatos  
11 não domiciliados e semidomiciliados afetados (FORLANI et al., 2021). Os gatos são notáveis  
12 vítimas da infecção por *S.brasiensis*, são altamente suscetíveis a doença, apresentam forma  
13 grave da doença, desenvolvendo lesões múltiplas, que apresentam uma grande quantidade de  
14 células leveduriformes ((MIRANDA et al., 2018a; MADRID et al., 2012; SCHUBACH et al.,  
15 2004) e apresentam o fungo nas garras e na cavidade oral (MACÊDO-SALES et al., 2018;  
16 MADRID et al., 2012; SCHUBACH et al., 2001; SCHUBACH et al., 2001). Isso associado ao  
17 comportamento social dos gatos, que lutam frequentemente e a lambedura entre eles, os  
18 distinguem de outras espécies e os caracterizam como disseminadores da esporotricose inter e  
19 intraespécie (SANCHOTENE et al., 2015, GREMIÃO et al., 2020; XAVIER et al., 2023;  
20 BARROS et al., 2010; NOBRE et al., 2001; RODRIGUES et al., 2020).

21 Além disso, as lesões em gatos predispõem a formação de granulomas incapazes de  
22 conter a disseminação da doença (MIRANDA et al., 2013), salientando o aumento dos  
23 linfócitos T CD8+ e falhas na resposta imune celular gato (MIRANDA, et al., 2016) ou altos  
24 níveis de IL-10 durante FIV e/ou coinfecções por FeLV, e baixos níveis de IL-4 (FeLV positivo)  
25 e IL-12 (FIV- positivo) (MIRANDA et al., 2018b), o que sugere desenvolver apresentações

1 clínicas graves nos felinos. Essas condições imunológicas que são pertinentes à espécie felina  
2 parecem dificultar a cura durante uma infecção por *S brasiliensis*, mesmo com tratamento  
3 antifúngico adequado. Assim, o gato assumiu um papel importante na cadeia epidemiológica  
4 da transmissão da doença para humanos, representando um risco substancial para saúde pública  
5 (BRANDOLT et al., 2019; MÂCEDO-SALES et al., 2018; SCHUBACH et al., 2015).

6 Assim, o tratamento eficaz dos gatos infectados é crucial para controlar a esporotricose  
7 felina e zoonótica. A esporotricose tem como tratamento padrão os antifúngicos, e para os gatos  
8 o itraconazol é recomendado como primeira opção (GREMIÃO et al., 2015). No entanto, a  
9 eficácia do itraconazol (ITZ) é limitada, com taxas de cura relatadas entre 40% a 77% e,  
10 também, a combinação de ITZ com outros antifúngicos (iodeto de potássio ou anfotericina B)  
11 não se mostrou benéfica, apresentando taxas de sucesso terapêutico de 48% e 73%,  
12 respectivamente (DE SOUZA et al., 2018; PEREIRA et al., 2014; GREMIÃO et al., 2011;  
13 REIS et al., 2012; DE MIRANDA et al., 2018; XAVIER et al., 2023). Muitos casos são  
14 comprovadamente refratários ao antifúngico convencional, assim é crescente o número de casos  
15 com falhas terapêuticas.

16 Dessa forma, reafirma a necessidade de rever as alternativas dentro do compêndio  
17 farmacológico e formas de tratamento. Dentre essas, pode-se citar como promissor a associação  
18 de estimulantes do sistema imunológico como adjuvantes no tratamento convencional com  
19 antifúngicos tradicionais, considerando o papel da imunidade celular e da modulação da  
20 inflamação granulomatosa, fármacos que auxiliem a resposta imune podem ser benéficos para  
21 esses pacientes (FORLANI et al., 2021; GUTERRES et al., 2014). A timomodulina é um  
22 extrato tímico que promove a modulação de linfócitos T e B e contribui para ação de vários  
23 tipos de células de defesa como neutrófilos, linfócitos e macrófagos, necessárias para o controle  
24 de micoses (ANDRADE, 2017; FORLANI et al., 2018). Corroborando, pesquisas previamente  
25 realizadas apontam que o uso de timomodulina como terapia adjuvante ocasiona em menor

1 tempo de remissão dos sinais clínicos extracutâneos, melhora o prognóstico e sobrevida de  
2 gatos com esporotricose cutânea disseminada num estudo prospectivo (FORLANI et al., 2021).

3 Adicionalmente, estudos anteriores determinaram a ação cicatrizante de duas  
4 formulações com ativos de extratos vegetais de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* (registro  
5 de solicitação de Patente junto ao INPI n° BR 10 2018 06970) para uso em feridas cutâneas  
6 abertas de pequenos animais. O potencial cicatrizante destes ativos foi estabelecido  
7 separadamente e sua ação conjugada comprovada em estudos pré-clínicos e clínicos no público-  
8 alvo. (CAPELLA et al., 2020; CAPELLA et al., 2016; TILMANN et al., 2014), evidenciou-  
9 se que as formulações aceleram o processo cicatricial e alcançando a cura clínica em um  
10 intervalo de tempo reduzido (CAPELLA et al., 2020). Em estudo, *in vivo* em modelo murino  
11 desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a timomodulina e a formulação  
12 contendo extrato oleoso de urucum e extrato etanólico de trigo (LCFT2002) como tratamento  
13 adjuvante de esporotricose otimizou o tratamento convencional por facilitar a cicatrização e  
14 potencializar a atividade antifúngica do itraconazol (dados ainda não publicados).

15 Assim, considerando o problema de saúde pública, além, da dificuldade na terapêutica  
16 de felinos e o potencial de adjuvantes testados em modelo murino, é evidente a necessidade de  
17 avaliar estes tratamentos como adjuvantes na esporotricose felina. Dessa forma, o objetivo foi  
18 avaliar a ação da timomodulina e da formulação tópica como adjuvantes terapêuticos ao  
19 tratamento convencional da esporotricose felina.

20

## 21 **MATERIAL E MÉTODOS**

22 *População de estudo*

23 A população deste estudo constituiu de uma amostra de 27 gatos atendidos no Hospital  
24 de Clínicas Veterinárias na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. Foram incluídos

1 no estudo gatos com esporotricose cutânea confirmada pelo isolamento fúngico em meio de  
2 cultura, de ambos os sexos, castrados ou não, com peso superior a 1kg e com idade superior a  
3 12 meses e inferior a 8 anos e que apresentaram estado geral bom a delicado.

4

5 *Estadiamento e diagnóstico*

6 Na primeira consulta, os gatos foram submetidos a exame clínico completo e coleta de  
7 amostra de sangue e amostras representativas da(s) lesão (ões) de pele. Durante o exame clínico  
8 foram avaliadas a presença de lesões na pele e mucosa nasal, presença de sinais extra cutâneos  
9 (conjuntivite, desidratação, palidez de mucosa, prostração, espirros, corrimento nasal ou  
10 dispneia) e estado geral. O estado geral e a apresentação clínica das lesões foram classificados  
11 conforme Schubach et al. (2004) e Miranda et al. (2013). O estado geral foi classificado em: S1  
12 (estado geral bom com ausência de sinais extracutâneos), S2 (estado geral regular, com sinais  
13 extracutâneos leves), S3 (estado geral delicado, com sinais extracutâneos moderado), S4  
14 (estado geral crítico, com sinais extracutâneos intensos). Foram excluídos do estudo os animais  
15 que apresentaram estado geral crítico. As lesões cutâneas foram contadas e classificadas de acordo  
16 com sua distribuição: L1 (lesões em apenas um local), L2 (lesões em dois locais não contíguos)  
17 e L3 (lesões em três ou mais locais não contíguos).

18 Na sequência foi selecionada uma lesão cutânea ativa para a coleta de exsudato com  
19 *swab* estéril e as amostras encaminhadas para citologia, cultura, identificação de *Sporothrix*  
20 spp. e ensaio de suscetibilidade antifúngica. Amostras de sangue periférico foram coletadas por  
21 punção venosa e amostras de soro foram obtidas para o diagnóstico da Imunodeficiência Viral  
22 Felina (FIV) e da Leucemia Viral Felina (FeLV) por imunoensaio enzimático usando o teste  
23 SNAP Combo FeLV/FIV (ALERE®) de acordo com as instruções do fabricante.

1 O diagnóstico da esporotricose através da citologia e da cultura micológica. Para a  
2 análise citológica foram confeccionados esfregaços de impressão, os quais foram corados pelo  
3 método Quick Panoptic e analisados por microscopia óptica quanto a presença e quantificação  
4 das células fúngicas. Para cultura micológica os *swabs* contendo exsudato das lesões cutâneas  
5 foram eluídos em 2mL de solução salina 0,9% agitados em vórtex por 2 min, cultivados em  
6 ágar Sabouraud dextrose com e sem cicloheximida ((Kasvi, Liofilchem®, Italy) e considerados  
7 positivos para *Sporothrix* spp. pelas características macro e micromorfológicas. Os isolados  
8 fúngico obtidos dos gatos foram armazenados na coleção micológica do Laboratório de  
9 Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande (LabMico  
10 FAMED-FURG).

11 Para análise histopatológica a coleta das amostras de lesões cutâneas, foi selecionado  
12 um local pelo critério de maior extensão no caso de lesões múltiplas para biópsia. A biópsia por  
13 punch de 8mm foram obtidas da borda da lesão cutânea ativa selecionada após assepsia local  
14 com álcool 70% e foram utilizados protocolos anestésicos adaptados as condições de cada  
15 paciente, foi fixada por 48 horas em formalina tamponada neutra a 10% para exame  
16 histopatológico.

### 17 *Tratamento*

18 O tratamento dos gatos deu-se início na primeira consulta quando o exame  
19 citopatológico foi positivo para formas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix* spp. No caso  
20 dos gatos com exame citopatológico negativo na primeira consulta, o tratamento foi iniciado  
21 quando o exame micológico foi positivo para *Sporothrix*, o que ocorreu 7 a 30 dias após  
22 primeira consulta. Os animais foram divididos de acordo com a ordem dos atendimentos e  
23 pareamento em quatro grupos: GITF tratados com ITZ, timomodulina e formulação tópica; GIT  
24 tratado com ITZ e timomodulina; GIF tratado com ITZ e formulação tópica; GI tratado com  
25 itraconazol. Considerando a gravidade da esporotricose em gatos, se optou por ter todos os

1 animais tratados com itraconazol por uma questão de ética e bem-estar animal. O itraconazol  
2 foi utilizado na forma de cápsulas por via oral a cada 24 horas, o protocolo terapêutico ocorreu  
3 de acordo com Gremião et al. (2020), gatos com  $\geq 3\text{kg}$  receberam a dose de 100mg/24h,  
4 gatos  $\geq 1\text{kg}$  e  $< 3\text{kg}$  receberam a dose de 50mg/24h, gatos. Os animais que foram tratados com  
5 timomodulina (cápsula) receberam a dose de 4mg/kg por via oral a cada 24 horas conforme o  
6 estudo de Forlani et al. (2021). As drogas foram administradas junto ao alimento de rotina do  
7 paciente com comida. Para a terapia tópica as feridas foram limpas diariamente com solução  
8 salina 0,9%, com a posterior aplicação dos tratamentos tópicos propostos a cada grupo,  
9 utilizando aplicador específico com espátula descartável para melhor administração dos  
10 produtos e reduzindo o contato direto com as lesões cutâneas para todos os momentos de  
11 manipulação dos animais, foi preconizado uso de equipamento de proteção individual, como  
12 luvas descartáveis, vestimentas de mangas longas, entre outros.

13 *Acompanhamento*

14 A resposta clínica à terapia foi monitorada por verificações semanais durante o período  
15 de 60 dias. Nestes momentos, foram realizados registro fotográfico das lesões com câmera  
16 digital, mantida uma distância constante de aproximadamente 18 cm com auxílio de régua  
17 milimetrada. Com o registro fotográfico foram obtidas as medidas das áreas das feridas através  
18 de *software* de avaliação de imagens (ImageJ® e Gimp2®), segundo metodologia de Abdala  
19 (2009) e Fernandes et al (2015), de forma semi automatizada. Cada lesão teve as medidas de  
20 área obtidas ao longo do processo cicatricial relacionadas a área total da lesão no momento pré-  
21 tratamento com o auxílio do *software* Broffice.org Calc, assim obtendo retração cicatricial  
22 relativa de cada lesão.

23 Também, foram realizados semanalmente em duplicata coleta de exsudato utilizando  
24 swab estéril de todas as lesões dos felinos para citologia. A partir dessas amostras foram  
25 confeccionados esfregaço de impressão, os quais foram corados pelo método Quick Panoptic e

1 analisados por microscopia óptica quanto a presença e quantificação das células fúngicas em  
2 cada lâmina até cicatrização da lesão ou, caso a lesão não tenha cicatrizado final do período  
3 experimental (60 dias).

4 Ademais, foram realizadas biópsias adicionais na mesma região e lesão cutânea  
5 escolhida na primeira biópsia, estas ocorreram entre 25 à 35 dias e 55 à 65 dias (respectivamente  
6 B2 e B3) após o início do tratamento para determinar a progressão das alterações histológicas  
7 na pele. Se a lesão cutânea estivesse cicatrizada no momento da segunda biópsia (B2), esta era  
8 a última biópsia realizada, sendo excluída a terceira biópsia. A amostra de pele com lesão  
9 biopsiada em B2 e B3 foi processada para exame histopatológico conforme descrito  
10 anteriormente para a primeira biópsia.

11 *Classificação do desfecho clínico*

12 Os desfechos clínicos foram classificados adaptado de Souza et al. (2018) como cura  
13 clínica (gatos com remissão completa das lesões cutâneas e sinais extra cutâneos de  
14 esporotricose durante o período de acompanhamento), progressão do tratamento (gatos que  
15 apresentaram melhora das lesões cutâneas e sinais extracutâneos durante o período de  
16 acompanhamento) ou falha do tratamento (gatos que apresentaram estagnação ou agravamento  
17 das lesões cutâneas e sinais extracutâneos). Os gatos que após 60 dias de acompanhamento não  
18 tinham obtido cura clínica seguiram o tratamento priorizando o bem-estar do felino, mas sem  
19 acompanhamento do experimento.

20 *Avaliação de alterações histológicas*

21 As amostras de biópsia de pele inseridas em formalina tamponada neutra a 10% foram  
22 processadas para inclusão em parafina de rotina, seccionadas a 5 µm e coradas com  
23 hematoxilina e eosina (H&E), coloração metenamina de prata de Grocott (Grocott) e ácido  
24 periódico de Schiff (PAS). As amostras teciduais foram processadas e coradas por Hematoxilina-

1 eosina (HE), pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) e metenamina de prata de Grocott, para  
2 avaliação das células inflamatórias, evidenciar e quantificar as células fúngicas.

3 As lâminas coradas com HE foram utilizadas para classificar as lesões do tecido e  
4 infiltrações celulares. A inflamação foi classificada quanto ao tipo, em piogranuloma,  
5 granuloma e abscesso; quanto a distribuição se difusa, focal ou multifocal; quanto a localização  
6 epiderme, derme superficial, derme profunda e hipoderme; quanto a presença e a predominância  
7 das células inflamatórias como macrófagos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, células  
8 epiteloides e células gigantes, assim conforme, a quantidade foi dado escores se ausente (0),  
9 escasso (1), moderado (2) ou intensa (3). A fibrose foi avaliada a quantidade é esse através de  
10 escores se ausente (0), escassa (1), moderada (2) ou intensa (3); a maturidade se madura ou  
11 imatura; e se havia ou não presença de epiteliação. As lâminas coradas com PAS e Grocott  
12 foram utilizadas para melhor identificação das estruturas fúngicas. A quantidade de estruturas  
13 fúngicas foi feita em escores sendo considerados ausente (0), escassa (1), moderada (2) ou  
14 intensa (3).

15 *Identificação de espécies de Sporothrix.*

16 A identificação molecular foi realizada por PCR-RFLP (Restriction Fragment Length  
17 Polymorphism), conforme descrito em Rodrigues et al., 2015. Resumidamente, o DNA foi  
18 obtido e purificado diretamente de colônias com 10 dias de idade em inclinações, seguindo o  
19 protocolo do kit Fast DNA (MP Biomedicals, Vista, CA, EUA).<sup>6</sup> Calmodulin- O gene  
20 codificador (CAL) foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores CL1 e CL2A26 e  
21 posteriormente digerido com a enzima HhaI.<sup>25</sup> Os produtos digeridos foram submetidos a  
22 eletroforese em géis de agarose a 2,5% (p/v) por 90 min a 100 V na presença de GelRedTM  
23 (Biotium, Hayward, CA, EUA). As bandas foram visualizadas utilizando o sistema de imagem  
24 L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) sob iluminação UV. A cepa de

1 referência CBS 120339 de *S. brasiliensis* foi utilizada como controle de qualidade para CAL-  
2 RFLP. (SANCHOTENE et al., 2015)

3 *Ensaio de suscetibilidade antifúngica*

4 A técnica de microdiluição do caldo foi realizada de acordo com as diretrizes do M38-  
5 A2 (CLSI, 2008). Os isolados fúngicos dos gatos foram recuperados da coleção micológica do  
6 Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande  
7 (LabMico FAMED-FURG), e uma cepa padrão de *Sporothrix brasiliensis* foi incluída como  
8 controle. O inóculo fúngico foi individualmente preparado em ágar Batata Dextrose a 30°C por  
9 sete dias e ajustado para uma transmitância de 80-82% (530 nm). As suspensões foram diluídas  
10 em meio RPMI-1640 tamponada com glicose 2% e MOPS nas proporções de 1:50 (v/v). O  
11 itraconazol (Sporanox®, Janssen Pharmaceutical) foi testado em diluição dupla em  
12 concentrações de 16 a 0,03 µg/mL (CLSI, 2008). As microplacas foram incubadas a 35 °C por  
13 72 h, e a MIC foi determinada como a menor concentração sem crescimento fúngico visível.  
14 Os testes foram realizados em duplicata. Embora não haja um ponto de corte para as espécies  
15 de *Sporothrix*, como critério de sensibilidade neste estudo, seguimos o valor de corte  
16 epidemiológico (ECV) proposto por Espinel-Ingroff et al. (2017), que afirma que valores de  
17 MIC < 2 µg/mL e ≥ 2 µg/mL podem ser considerados sensíveis e resistentes ao itraconazol,  
18 respectivamente.

19 *Análise estatística*

20 Para a análise de variação dos dados paramétricos foi realizada teste de ANOVA para  
21 dois fatores (quantidade de leveduras na citologia e área das lesões), teste qui quadrado (análise  
22 clínica e ensaio de suscetibilidade) e a análise da variação dos dados não paramétricos  
23 (histologia) foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis e Friedman, os valores p<0,05  
24 foram considerados significativos.

## 1 RESULTADOS

### 2 *Avaliação clínica*

3 O estudo totalizou 27 com a seguinte distribuição nos grupos: GITF, sete animais; GIT,  
4 sete animais; GIF, seis animais e GI, sete animais. Todos os gatos eram sem raça definida  
5 (SRD). A maioria dos gatos eram machos (20/27; 74%), jovens adultos (24/27; 88,89%), não  
6 castrados (24/27; 88,89%). Em relação a distribuição das lesões, sete (25,93%) foram  
7 classificados como L1, um (3,70%) como L2 e 19 (70,37%) como L3. O número de lesões nos  
8 gatos estudados variaram de apenas uma lesão a 11 lesões por animal. As apresentações clínicas  
9 das lesões foram similares entre os animais, apresentando nódulos, úlceras com exsudato  
10 serosanguinolento ou purosanguinolento e crostas. A maioria dos animais apresentaram teste  
11 sorológico negativo para retrovíroses (15/27; 55,6%), entre os positivos (12/27; 44,4%), nove  
12 (33,3%) foram positivos para FIV e somente três (11,1%) positivos para FeLV. Entre os gatos  
13 com retrovíroses positivos, sete apresentaram cura clínica, cinco progressão e nenhum falha  
14 terapêutica (Tabela 1).

15 Em relação ao estado geral dos gatos, 16 (59,3%) foram classificados como S1, oito  
16 (29,6%) como S2 e três (11,1%) como S3. Já a ocorrência de sinais não específicos de  
17 esporotricose, principalmente dispneia inspiratória e o espirro foi observada em oito gatos  
18 (29,6%) (Tabela 1).

19 Em relação ao desfecho no período experimental a maioria dos animais adquiriu cura  
20 clínica (16/27; 59,3%), oito gatos (29,6%) apresentaram progressão do tratamento e somente  
21 três (11,1%) gatos apresentaram falha do tratamento. Apesar de não ter havido uma diferença  
22 significativamente estatística, correlacionando com o grupo de tratamento teste, no grupo GITF  
23 quatro animais (57,1%) apresentaram cura clínica, dois (28,6%) progressão do tratamento e  
24 um (14,3%) falha terapêutica; o grupo GIT quatro animais (57,1%) apresentaram cura clínica e  
25 três (42,9%) progressão do tratamento e nenhuma falha terapêutica; o grupo GIF quatro (57,1%)

1 animais apresentaram cura clínica, um (14,3%) apresentou progressão do tratamento e um  
 2 (14,3%) falha do tratamento; o grupo GI quatro (57,1%) animais apresentaram cura clínica,  
 3 dois (28,6%) apresentaram progressão e um (14,3%) apresentou falha terapêutica (Tabela 1).

4 Tabela 1- Demonstração dos grupos de felinos com esporotricose distribuídos nos  
 5 grupos experimentais tratados com itraconazol, timomodulina e formulação tópica (GITF),  
 6 itraconazol e timomodulina (GIT), itraconazol e formulação tópica (GIF) e somente itraconazol  
 7 (GI)

Grupo de tratamento <sup>a</sup>	Status viral	Estado geral <sup>b</sup>	Número de lesões <sup>c</sup>	Sinais não específicos	Desfecho <sup>d</sup>	CIM (μg/mL)
GITF	FeLV	S1	L3	Não	CC	1
GITF	FIV	S1	L3	Não	CC	1
GITF	FIV	S3	L1	Não	CC	0,5
GITF	Negativo	S2	L3	Sim	CC	2
GITF	Negativo	S1	L3	Sim	FT	-
GITF	Negativo	S1	L3	Não	PG	0,5
GITF	Negativo	S2	L3	Não	PG	2
GIT	Negativo	S1	L1	Não	CC	-
GIT	Negativo	S2	L3	Sim	CC	-
GIT	Negativo	S1	L3	Não	CC	-
GIT	FIV	S1	L3	Não	PG	2
GIT	FIV	S2	L3	Sim	PG	1
GIT	FeLV	S1	L3	Sim	CC	-
GIT	FIV	S3	L3	Sim	PG	-
GIF	FIV	S2	L3	Sim	PG	1
GIF	Negativo	S1	L1	Não	CC	2
GIF	Negativo	S1	L1	Não	CC	2
GIF	Negativo	S1	L1	Não	CC	-
GIF	Negativo	S3	L3	Sim	FT	0,5
GIF	FIV	S2	L3	Não	CC	-
GI	FeLV	S1	L3	Não	CC	1
GI	Negativo	S1	L2	Não	CC	2
GI	FIV	S1	L1	Não	CC	1
GI	Negativo	S1	L3	Não	PG	1
GI	FIV	S2	L3	Não	PG	-
GI	Negativo	S2	L3	Não	FT	-
GI	Negativo	S1	L1	Não	CC	1

<sup>a</sup>Tratamento: GITF- itraconazol, timomodulina e LCFT2002; GIT- itraconazol e timomodulina; GIF- itraconazol e LCFT2002; GI- itraconazol. <sup>b</sup>Estado clínico geral: S1- Sem sinais clínicos extracutâneos, S2- sinais clínicos extracutâneos leves, S3-sinais extracutâneos moderados. <sup>c</sup>Apresentação clínica das lesões L1- animais com apenas uma lesão, L2 - animais com duas lesões não coalescentes; L3 - animais com três ou mais lesões não coalescentes. <sup>d</sup>Avaliação do tratamento: CC (cura clínica): completa remissão das lesões; PG (progressão): melhora nas lesões; FT (falha do tratamento): estagnação ou agravamento das lesões.

1     13    *Avaliação do registro fotográfico*

2           Os grupos que receberam terapia imunomoduladora (timomodulina) ou formulação  
3           tópica combinado com terapia convencional (itraconazol) (GITF, GIT e GIF) demonstraram  
4           uma notável aceleração no processo de cicatrização. O grupo GITF apresentou uma redução de  
5           50% em suas áreas de lesões após 14 dias de tratamento, atingindo uma redução superior a 75%  
6           aos 21 dias, metade dos animais cicatrizaram as lesões antes dos 60 dias e um animal apresentou  
7           falha terapêutica e morreu. No grupo GIT, a redução de 50% foi observada aos 21 dias, 71,43%  
8           (5/7) cicatrizaram as lesões antes dos 60 dias. Enquanto o grupo GIF alcançaram essa redução  
9           de 50% em 28 dias, metade dos animais cicatrizaram as lesões antes dos 60 dias, um animal  
10          apresentou falha terapêutica e veio a óbito. Por fim, o grupo GI mostrou uma redução de 50%  
11          em 28 dias, mas atingiu uma redução de 75% aos 35 dias, apenas 28,57% (2/7) cicatrizaram  
12          antes dos 60 dias.

13     14    *Avaliação citológica*

14           Antes do tratamento para esporotricose, a maioria dos gatos exibia uma quantidade  
15          incontável ( $\geq 500$ ) de células fúngicas no *imprint* de suas lesões. Com o início do tratamento,  
16          observou-se uma redução drástica nesse valor nos grupos GITF e GIT, com um decréscimo de  
17          10 vezes o valor inicial, em um período de sete e 14 dias respectivamente. Já o grupo GIF  
18          apresentou essa diminuição em 21 dias e o grupo GI ao longo de 42 dias. Os gatos que  
19          demonstraram melhora (cura clínica e progressão) ao longo período experimental apresentaram  
20          uma redução na carga fúngica durante as avaliações citológicas, independente do tratamento.  
21          Em contraste, os animais que mostraram estagnação ou piora durante esse período, observou-  
22          se o fenômeno oposto, caracterizado por um aumento na carga fúngica nas lesões ao longo das  
23          análises.

24     15    *Avaliação das alterações histológicas*

1 Antes de iniciar o tratamento as lesões dos gatos eram piogranulomatosas com  
2 distribuição difusa comprometendo da derme superficial até profunda. O exame histopatológico  
3 das biópsias do grupo GITF revelou que na B1 uma lesão piogranulomatosa, evoluindo para  
4 granulomatosa em 50% dos casos no momento B2 e no momento B3, predominou lesão  
5 cicatrizada mantendo-se apenas duas lesões com características granulomatosa. Essas lesões  
6 com distribuição predominantemente difusa e comprometimento da derme superficial até derme  
7 profunda ao longo das duas primeiras biópsias, enquanto no terceiro momento (B3) as lesões  
8 não cicatrizadas apresentaram distribuição difusa com comprometimento somente da derme  
9 profunda. Observou-se uma diminuição na quantidade de macrófagos em cada biópsia, sendo  
10 exacerbada na B1, moderada na B2 e ausente na B3. Assim como, uma diminuição de  
11 neutrófilos em cada biópsia, sendo moderados na B1, escassos na B2 e ausentes na B3. As  
12 células epitelioides até a B2 foram moderadas, tornando-se ausente na B3. Os linfócitos no  
13 primeiro momento apresentavam quantidade escassa, na B2 quantidade moderada e ausente no  
14 último momento (B3). As células gigantes prevaleceram ausentes em todos os momentos  
15 avaliados, com exceção de um único caso que se apresentou escassas na última biópsia (B3). A  
16 fibrose evolui com as biópsias de escassa em B1, moderada B2 e ausente na B3, tornando-se  
17 madura em 30 dias (B2), e a quantidade de células fúngicas escassas em B1 e ausentes em B2  
18 e B3 (Figura 1).

19 No grupo GIT, a lesão predominou como piogranulomatosa difusa em B1, em B2  
20 predominava granulomatosa, já em B3 a maior parte das lesões encontravam-se cicatrizadas,  
21 permanecendo apenas três lesões piogranulomatosa difusa. Neste grupo, o comprometimento  
22 da derme superficial até derme profunda permaneceu ao longo das duas primeiras biópsias,  
23 enquanto no terceiro momento (B3) as lesões não cicatrizadas apresentaram distribuição difusa  
24 com comprometimento somente da derme profunda. A quantidade macrófagos manteve-se  
25 moderada nas duas primeiras biópsias, enquanto B3 a prevalência era ausente. Já os linfócitos

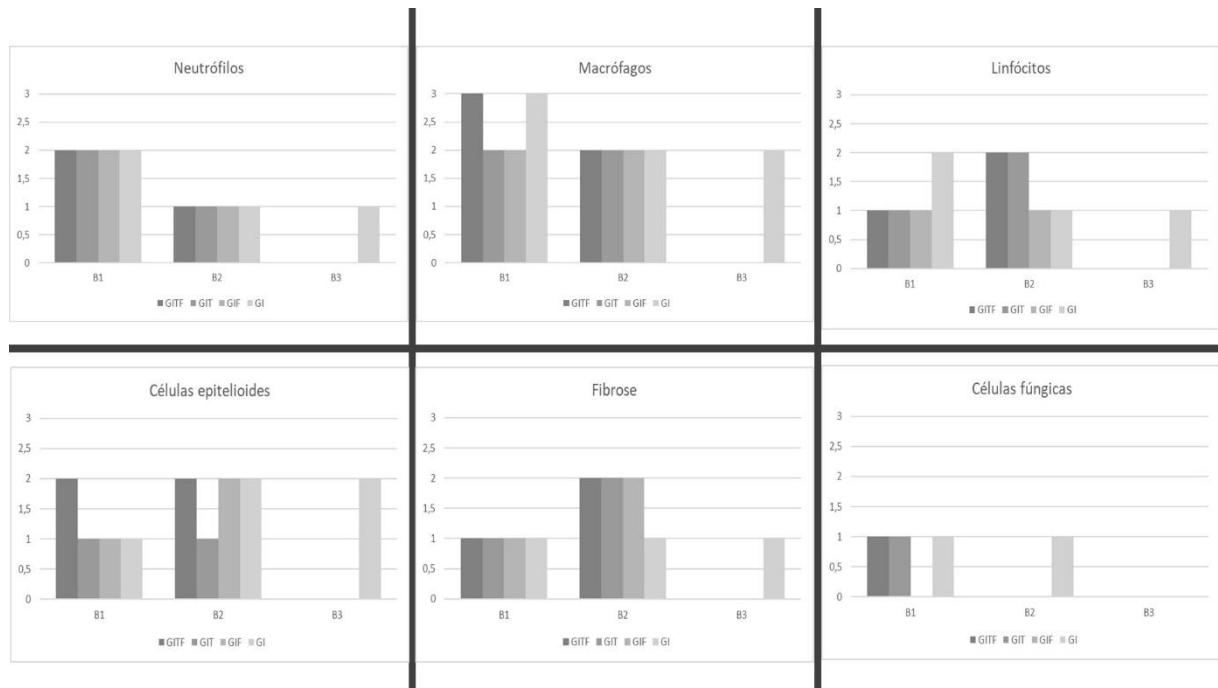
1 foram escassos em B1 e ausentes em B2 e B3. Os neutrófilos diminuíram a quantidade em cada  
2 biópsia, sendo moderados na B1, escassos na B2 e ausentes na B3. As células epitelioides foram  
3 escassas na B1 e B2, tornando-se ausentes em B3. As células gigantes foram ausentes em todos  
4 os momentos de biopsia. A fibrose foi em quantidade escassa e imatura em B1, moderada e  
5 madura em B2 e ausente em B3. A quantidade de células fúngicas, foi escassa na B1, não sendo  
6 mais detectada a partir da segunda biópsia (B2) (Figura 1).

7 Já no grupo GIF, a lesão foram predominantemente piogranulomatosa em B1, já na B2  
8 a maioria das lesões estava cicatrizada, restando duas lesões que ainda não estavam cicatrizadas  
9 50% encontrava-se piogranulomatosa e 50% granulomatosa, assim como em B3. O granuloma  
10 apresentava-se difuso em todos os momentos avaliados. O comprometimento era derme  
11 superficial em B1 e B2, e em B3 50% apresentavam comprometimento de derme superficial. Já  
12 a derme profunda foi comprometida nas três biopsias. A quantidade de macrófagos se manteve  
13 exacerbada na B1 e B2, e ausente em B3. Os linfócitos foram escassos em B1 e B2, e ausentes  
14 em B3. Os neutrófilos reduziram com o passar das biopsias, estando moderada em B1, escassa  
15 em B2 e ausente em B3. As células epitelioides encontrava-se escassa em B1, moderada em B2  
16 e ausente na B3. Não houve predomínio de células gigantes nas biópsias. A quantidade de  
17 fibrose foi escassa e imatura em B1 evoluindo moderada e imatura em B2 e ausente em B3, já  
18 que a maioria das lesões estava cicatrizada. A quantidade de células fúngicas era ausente em  
19 todas as biópsias (Figura 1).

20 No grupo GI, a lesão foram predominantemente piogranulomatosa difusa em B1 e B2,  
21 se tornando granulomatosa difusa em B3. Com comprometimento da derme superficial até a  
22 derme profunda em todos os momentos. A quantidade de macrófagos foi exacerbada em B1,  
23 moderada em B2 e B3. Os linfócitos foram moderados em B1, e escassos em B2 e B3. Os  
24 neutrófilos diminuíram a quantidade em cada biópsia, sendo moderados na B1, escasso na B2  
25 e B3. As células epitelioides foram ausente na B1, evoluindo para moderadas a partir da B2 e

1 B3. As células gigantes foram ausentes em todas as biópsias. E a quantidade de fibrose se  
 2 manteve escassa e imatura em todas as biópsias. O predomínio de presença de células fúngicas  
 3 nas lesões foi ausente em B1, escasso em B2 e ausente em B3 (Figura 1).

4



6 Figura 1. Demonstração da mediana de escores de quantidade de neutrófilos, macrófagos,  
 7 linfócitos, células epitelioides, fibrose e células fúngicas, indicando ausente (0), escasso (1),  
 8 moderado (2) e exacerbado (3) de feridas dos gatos com esporotricose tratados com itraconazol,  
 9 timomodulina e formulação tópica (GITF); itraconazol e timomodulina (GIT); itraconazol e  
 10 formulação tópica (GIF) e itraconazol (GI).

11 *Identificação de espécies de Sporothrix. e ensaio de suscetibilidade antifúngica*

12 De todos os 27 felinos incluídos no estudo, foram recuperadas amostras de 17 felinos  
 13 para a realização do PCR, o qual identificou todas as amostras como pertencentes a espécie *S.*  
 14 *brasiliensis*. Ao analisar a CIM em relação ao desfecho clínico, não foi possível estabelecer  
 15 uma relação consistente. Supreendentemente, animais classificados como resistentes com base

1 no seu valor de CIM apresentaram cura clínica e alguns classificados como sensíveis ocorreu  
2 falha terapêutica.

3

4 **DISCUSSÃO**

5 A maioria dos animais apresentaram teste sorológico negativo para retrovíroses, sendo  
6 nove positivos para FIV e somente três positivos para FeLV. Demonstrando que apesar das  
7 retrovíroses em gatos resultarem em imunodeficiência, não tem relação com o desenvolvimento  
8 da esporotricose em gatos (GREMIÃO et al., 2015; SOUZA et al., 2005), a imunossupressão  
9 não é necessária para infecção ou manifestação clínica da doença (LLORET et al., 2013).  
10 Entretanto, o perfil de gatos com esporotricose e gatos com retrovíroses é o mesmo, que é  
11 composto de jovens, machos, não castrados e com livre acesso às ruas (FORLANI et al., 2021),  
12 em especial a transmissão da Imunodeficiência Viral Felina (FIV) que acontece através,  
13 principalmente, de feridas de mordidas que introduzem saliva contendo vírus (LITTLE et al.,  
14 2020). Não foi observada relação da cura a co-infecção com retrovírus, assim como descrito  
15 por Miranda et al. (2018a), uma vez que nenhum gato com retrovírose positivo apresentou falha  
16 terapêutica.

17 Em relação ao estado geral dos gatos, apesar da literatura relatar que o estado clínico  
18 geral do gato, a ocorrência de sinais respiratórios, bem como o número, extensão e localização  
19 das lesões são fatores que podem influenciar o prognóstico (GREMIÃO et al., 2020), não foi  
20 observado interferência no resultado do tratamento dos animais nesses quesitos isolados, mas  
21 talvez a associação deles ocasiona falha terapêutica.

22 Os animais tratados com GITF apresentaram em menor tempo redução da quantidade  
23 de leveduras e da área das lesões. No estudo in vitro, evidenciou a ação de sinergismo entre o  
24 itraconazol que atua na eliminação da do agente fúngico enquanto a timomodulina atua

1 estimulando o organismo no combate inespecífico da lesão provocada pelo fungo , já que  
2 modula células de defesa e formulação acelerando cicatrização das lesões e reduzindo o tempo  
3 para cicatrização (dados ainda não publicados)

4 Corroborando com isso, na histologia demonstrou padrão inflamatório com maior  
5 quantidade de células epitelioides, linfócitos e fibrose com o tratamento quando comparado  
6 com grupo controle (GI). A formulação tópica possui efeito pró-inflamatório, indutor de  
7 angiogênese e estimulante de fibroplasia, o que interfere no potencial terapêutico de ação  
8 cicatrizante (CAPELLA et al., 2020). Enquanto a timomodulina desempenha como mecanismo  
9 de ação a imunomodulação, potencializando o sistema imune, modulando linfócitos T e B,  
10 assim como, apropriado funcionamento de células de defesa contra infecções fúngicas como  
11 neutrófilos e macrófagos (ANDRADE, 2017), com isso potencializando uma resposta imune  
12 eficiente contra a infecção fúngica. Ademais, a presença de fibrose dérmica está relacionada a  
13 cura clínica (DE SOUZA et al., 2018).

14 O GIT apresentou histologicamente semelhante ao GITF, mas em relação ao desfecho  
15 clínico, o grupo GIT não apresentou nenhuma falha terapêutica, apresentando melhor resposta  
16 do que os outros tratamentos. No entanto, um pouco maior o tempo para redução da área das  
17 lesões e diminuição da quantidade de leveduras na citologia. A diferença está na presença da  
18 formulação que no período inicial de tratamento possui com efeito pró-inflamatório, indutor de  
19 angiogênese e estimulante de fibroplasia, o que possivelmente interfira positivamente no  
20 potencial terapêutico de ação cicatrizante (CAPELLA et al., 2020). Essa resposta da formulação  
21 no período inicial ocasiona em um tratamento com resposta mais eficiente em relação a  
22 cicatrização e diminuição da quantidade de leveduras nas lesões.

23 O grupo GIF, apesar de apresentar melhor resposta clínica, redução da área das lesões e  
24 cicatrização do que o grupo controle, entre os grupos testes (GITF e GIT) ele foi o que  
25 apresentou resposta menos eficiente. As formulações não tem efeito antifúngico (dados ainda

1 não publicados). Isso indica que a formulação atua no processo inflamatório local, auxiliando  
2 na reparação tecidual, na limpeza do tecido evitando contaminações secundárias (CAPELLA  
3 et al., 2020), mas não diretamente nas ações contra o agente fúngico. Na histologia, a diferença  
4 dos grupos com timomodulina e não está nas quantidades de linfócitos.

5 Todas as amostras foram pertencentes a espécie *S. brasiliensis*. Supreendentemente,  
6 animais classificados como resistentes com base no seu valor de CIM apresentaram cura clínica  
7 e alguns classificados como sensíveis ocorreu falha terapêutica. Isso dificulta porque não pode  
8 usar o *in vitro* não relaciona com a resposta do animal ao tratamento, possivelmente por uma  
9 resposta individual do paciente felino. Assim, apesar da susceptibilidade antifúngica da cepa,  
10 pode haver outras razões para falta de resposta ao tratamento que não envolvem apenas este  
11 parâmetro, mas também fatores do hospedeiro (ALMEIDA-PAES et al., 2017). Salientando  
12 que o monitoramento através da citologia das lesões é uma alternativa viável. Nos nossos  
13 tratamentos associados com os compostos adjuvantes, o tempo de eliminação do fungo nas  
14 lesões cutâneas ulceradas foram em menores tempos do que descrito anteriormente (12  
15 semanas) (MIRANDA et al., 2018b), demonstrando uma redução precoce não só na melhora  
16 clínica como também do risco da transmissão zoonótica

17 Assim o presente estudo expõe que o tratamento com adjuvantes como timomodulina e  
18 formulação tópica com extratos vegetais de trigo e urucum combinada com o tratamento  
19 convencional otimiza o processo terapêutico da esporotricose felina pelo aumento da resposta  
20 inflamatória. Destacando como eficiente para uma resposta clínica mais rápida com cicatrização  
21 das lesões, menor quantidade fúngica e, consequentemente, reduzindo o risco de transmissão  
22 zoonótica.

23

24

1 **CONCLUSÃO**

2       Conclui-se que a timomodulina e a formulação tópica são eficientes como um composto  
3       adjuvante a terapia com itraconazol no tratamento da esporotricose felina, uma vez que o animal  
4       apresentará redução da área, cicatrização e diminuição da quantidade de leveduras fúngicas nas  
5       lesões mais rápida pela ação conjunta de células inflamatórias agindo para cicatrização e,  
6       consequentemente, auxiliando o itraconazol na sua atividade fungicida.

7

8 **AGRADECIMENTOS**

9       À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - código de  
10      financiamento 001, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
11      Tecnológico) - código de financiamento 308152/2019-0, a FAPERGS (Fundação de Amparo à  
12      pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) - código de financiamento 19/2551-0001904-1 e  
13      Universidade Federal de Pelotas pelo apoio financeiro as pesquisas e aos pesquisadores

14

15 **DECLARAÇÃO DE INTERESSES CONFLITANTES**

16       Não temos conflito de interesse a declarar.

17

18 **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

19       Todos os autores contribuíram igualitariamente para concepção e escrita do manuscrito.

20       Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

21

22

23

1    **COMITE DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

2        Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação  
3        Animal sob o registro nº 3074-2018.

4

5    **REFERÊNCIAS**

6        ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S. et al. Refractory  
7        sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo  
8        resistance. **Medical mycology**, v. 55, n. 5, p. 507-517, 2017.

9        ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária: consulta rápida**. 1 Ed.-1. Ed. Rio de  
10      Janeiro: Rocca, 2017.p. 240 e p. 317.

11      BARNACLE, J. E. et al. The first three reported cases of *Sporothrix brasiliensis* cat-transmitted  
12      sporotrichosis outside South America. **Medical Mycology Case Reports**, v. 39, p. 14–17,  
13      2023.

14      BARROS, M.B.L. et al. Esporotricose: A evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista**  
15      **Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 27, n. 6, p.  
16      455–460, 2010.

17      BRANDOLT, T.M. et al. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in Southern Brazil, 2012-  
18      2017. **Medical mycology**, v. 57, n. 5, p. 527-533, 2019.

19      CAPELLA 2016

20      CAPELLA, Sabrina et al. Potencial terapêutico de Fármacos com ativos de *Bixa orellana* L. e  
21      *Triticum aestivum* no tratamento de lesões térmicas. **Research, Society and Development**, v.  
22      9, n. 3, p. 29, 2020.

23      CÓRDOBA, S. et al. Molecular identification of *Sporothrix brasiliensis* causing feline  
24      sporotrichosis in Argentina. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. 117–120, 2018. DOI:

- 1 <https://doi.org/10.1093/mmy/myx045>.
- 2 DE SOUZA, E.W. et al. Clinical features, fundal load, coinfections, histological skin changes  
3 and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix*  
4 *brasiliensis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- 5 ETCHECOPAZ, A. N. et al. Molecular epidemiology of *Sporothrix brasiliensis* in cats in  
6 Buenos Aires, Argentina. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 4, p. 107, 2019.
- 7 FERNANDES, K. S.S. et al. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and  
8 their susceptibility to nitric oxide. **Immunology**, v. 101, n. 4, p. 563–569, 2000. Disponível  
9 em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00125.x>
- 10 FORLANI, S.G. et al. Esporotricose em um felino soropositivo para FeLV- relato de caso.  
11 **Clinica Veterinaria**, n. 137, p. 58-64, 2018.
- 12 FORLANI, G.S. et al. Thymomodulin in association with antifungal drugs in the therapy of  
13 cats with disseminated cutaneous sporotrichosis: a prospective study. **Ciência Rural**, v. 51, n.  
14 6, 2021.
- 15 GARCIA, N. G. et al. First isolation of *Sporothrix brasiliensis* from a cat with sporotrichosis  
16 in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 3, p. 157–158, 2017.  
17 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.01.005>.
- 18 GREMIÃO, I. D. F. et al. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious  
19 Diseases**, v. 26, n. 3, p. 621–624, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2603.190803>
- 20 GREMIÃO, I.D. et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical  
21 Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2015.
- 22 GUTERRES, K.A. et al. The use of (1-3)  $\beta$ -glucan along with itraconazole against canine  
23 refractory sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3-4, p. 217-221, 2014.  
24 <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9736-6>

- 1 LITTLE, Susan et al. 2020 AAFP feline retrovirus testing and management guidelines. **Journal**  
2 **of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 1, p. 5-30, 2020.
- 3 LLORET, A. et al. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management, v.  
4 15, n. 7, p. 619-623, 2013. <https://doi.org/10.1177/1098612X13489225>
- 5 KAADAN, M. I. et al. One Health Education for Future Physicians: A Case Report of Cat-  
6 Transmitted Sporotrichosis. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, ofaa049,  
7 2020. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa049>
- 8 MACÊDO-SALES, P.A. et al. Domestic feline contribution in the transmission of Sporothrix  
9 in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations.
- 10 **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 19, p. 1-10, 2018. [https://doi.org/10.1186/s12917-018-1340-4](https://doi.org/10.1186/s12917-018-<br/>11 1340-4)
- 12 MADRID, I.M. et al. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis:  
13 A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n.  
14 4, p. 265–273, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9509-4>
- 15 MIRANDA, L.H. et al. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and  
16 their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology and**  
17 **Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p. 425-432, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.03.005>
- 18 MIRANDA, L. H.M. et al. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population  
19 of CD8<sup>low</sup> cells and a decrease in CD4<sup>+</sup> cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 29–39, 2016.  
20 Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myv079>
- 21 MIRANDA, L. H. M. et al. Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin  
22 lesions of cats for predicting antifungal treatment response. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 92,  
23 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof4030092>
- 24 MIRANDA, L. H. M. et al. Co-infection with feline retrovirus is related to changes in

- 1 immunological parameters of cats with sporotrichosis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0207644,  
2 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207644>
- 3 NOBRE, M.O. et al. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista**  
4 **Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 137-140, 2001.
- 5 REIS, E.G. et al. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline  
6 sporotrichosis: a prospective study. **Medical Mycology**, v. 54, n.7, p. 684-690, 2016.
- 7 RODRIGUES, A.M. et al. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS**  
8 **neglected tropical diseases**, v. 9, n. 12, 2015.
- 9 RODRIGUES, A.M. et al. *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in na armadillo's  
10 burrow. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3-4, p. 199-206, 2014.
- 11 RODRIGUES, A.M. et al. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven  
12 by animal-animal transmission. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, 2016.
- 13 SANCHOTENE, K. O. et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of  
14 feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652–658, nov. 2015. DOI: 10.1111/myc.12414
- 15 SOUZA, L. L. et al. Esporotricose em gatos portadores do vírus da leucemia felina. **Revista**  
16 **Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1–3, p. 99–101, jan. 2005.
- 17 THOMSON, P. et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreak in domestic cats in Magallanes, Chile:  
18 a One Health approach study. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 226, 2023. DOI:  
19 <https://doi.org/10.3390/jof9020226>
- 20 XAVIER, Melissa Orzechowski et al. *Sporothrix brasiliensis*: epidemiology, therapy, and  
21 recent developments. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p. 921, 2023.
- 22 ZHANG, Y., et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more  
23 than 14,000 human and animal case reports. **Persoonia – Molecular Phylogeny and**  
24 **Evolution of Fungi**, vol. (dez. 2015) .

## 4 Considerações Finais

Esse é o primeiro estudo *in vivo* em animais experimentais e felinos avaliando o potencial terapêutico da timomodulina no tratamento de enfermidades e um dos poucos estudos avaliando imunomodulador no tratamento da esporotricose. Também, é o primeiro avaliando tratamento com formulação tópica para esporotricose.

Esse estudo expôs que a timomodulina e a formulação tópica LCFT2002 são eficientes como um composto adjuvante a terapia com itraconazol no tratamento da esporotricose. As formulações tópicas não apresentam atividade fungicida frente a *Sporothrix brasiliensis*, de acordo com os extratos não terem ação sinérgica associados. No entanto, as formulações influenciam no processo cicatricial de lesões em modelo experimental e em felinos pela ação pró inflamatória local, enquanto a timomodulina age de forma sistêmica pela atividade conjunta de células inflamatórias facilitando cicatrização e, consequentemente, auxiliando o itraconazol na sua atividade fungicida

Com isto possibilitando um grande avanço científico que implicará no tratamento de casos de esporotricose cutânea levando a redução de casos graves de esporotricose disseminada/sistêmica nos felinos. Determinando uma resposta também na saúde pública por diminuir a doença nos animais transmissores e, com isto, reduzindo os riscos de casos de esporotricose humana.

## Referências

- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F. D.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo resistance. **Medical Mycology**, v. 55, n. 5, p. 507-517, 2017.
- ALVES, S. F. et al. Extraction methods and antifungal activity of phenolic compounds from cereals. **Food Research International**, v. 144, p. 110327, 2021.
- ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária: consulta rápida**. 1 Ed.-1. Ed. Rio de Janeiro: Rocca, 2017.p. 240 e p. 317
- BARNACLE, J. R.; CHOW, Y. J.; BORMAN, A. M.; WYLLIE, S.; DOMINGUEZ, V.; RUSSEL, K.; ROBERTS, H.; ARMOSTRONG0J, D.; WHITTINGTON, A. The first three reported cases of *Sporothrix brasiliensis* cat-transmitted sporotrichosis outside South America. **Medical Mycology Case Reports**, v. 39, p. 14-17, 2023.
- BARROS, M. B. D.L.; SCHUBACH, T. M. P.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C; SCHUBACH, A. D.O.; MONTEIRO, P. C. F.; REIS, R. S.; BARROS, M. B. D. L.; SCHUBACH, A. D. O.; DO VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S. R.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, n.4, p.529-535, 2004.
- BARROS, M. B. D. L.; SCHUBACH, T. M. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.
- BARROS, M. B. D. L.; SCHUBACH, T. M. P.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; SCHUBACH, A. D. O.; MONTEIRO, P. C. F.; REIS, R. S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; LAZÉRA, M. D. S.; CUZZI-MAYA, T. C.; BLANCO, T. C. M.; MARZOCHI, K. B. F.; WANKE, B. & VALLE, A. C. F. D. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777-779, 2001.
- BARROS, M.; SANTOS, P. R.; RODRIGUES, A. B.; ALMEIDA, T. S. Ação antifúngica de extrato oleoso de urucum sobre *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. **Revista Pesquisa em Saúde**, v. 16, n. 1, p. 36–40, 2015.
- BARROS, M.B.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.; WANKE, B.; LAMBERT-PASSOS, S.R. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological

aspects of a series of cases. **Epidemiological & Infection**, v.136, n.9, p. 1192-1196, 2008.

BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; DE CAMARGO, Z. P.; NUCCI, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.; ROZENTAL, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 178–188, 2014.

BRANDOLT, T. M.; MADRID, I. M.; POESTER, V. R. P.; SANCHOTENE, K. O.; BASSO, R. P.; KLFKE, G. B.; RODRIGUES, M. D. L.; XAVIER, M. O. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in Southern Brazil, 2012-2017. **Medical mycology**, v.57, n. 5, p. 527-533, 2019.

BRILHANTE, R. S. N.; RODRIGUES, A. M.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; CAMARGO, Z. P. In vitro susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 275–279, 2015.

BRITO, R. S. A.; CAPELLA, S. O.; HOFFMANN, J. F.; FREITAG, R. A.; BRUM, F. R. P.; NASCENTE, P. S.; SCHRAMM, R. C.; VIANNA, R. JORGE, S. J.; NOBRE, M.O. Avaliação de extratos vegetais em formulações farmacêuticas no tratamento da otite externa canina. **Medicina Veterinária**, v. 15, n. 4, p. 332-339, 2021.

CAPELLA, S. O; TILLMANN, M. T.; FÉLIX, A. O. C.; FONTOURA, E. G.; FERNANDES, C. G.; FREITAG, R. A.; SANTOS, M. A. Z.; FÉLIX, S. R.; NOBRE, M.O. Potencial cicatricial da Bixa Orellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 104-112, 2016.

CAPELLA, S.O; KRUG, F.; TILLMANN, M.T.; VIANNA, R.; ARANHA, B.C.; CHAVES, F. C.; FREITAG, R.A.; BRUHN, F.R.; FERNANDES, C.G.; NOBRE, M. O. Potencial terapêutico de fármacos com ativos de Bixa Orellana L. e Triticum aestivum no tratamento de lesões térmicas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 3, p. 9, 2020

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; MOCHJZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.

CHAVES, A. R.; de CAMPOS, M. P.; BARROS, M. B. L.; DO CARMO, C. N.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P Treatment abandonment in feline sporotrichosis—Study of 147 cases. **Zoonoses and public health**, v. 60, n. 2, p. 149-153, 2013.

CHEN, Y. et al. Synergistic interactions of natural compounds with antifungal drugs against *Candida species*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1286, 2017.

CÓRDOBA, S.; ISLA, G.; SZUSZ, W.; VIVOT, W; HEVIA, A.; DAVEL, G.; CANTEROS, C. E. Molecular identification of *Sporothrix brasiliensis* causing feline sporotrichosis in Argentina. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. 117–120, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myx045>.

CUNHA, L. C. et al. Antifungal activity of *Bixa orellana* L. (urucum): a review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 13, n. 6, p. 129–135, 2019.

DANIELLI, L. J.; PIPPI, B.; DUARTE, J. A.; MACIEL, A. J.; LOPES, W.; MACHADO, M.M.; OLIVEIRA, L. F. S.; VAINSTEIN, M. H.; TEIXEIRA, M. L.; BORDIGNON, S. A.; FUENTEFRIA, A. M.; APEL, M. A. Antifungal mechanism of action of *Schinus lenticifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect in vitro with terbinafine and ciclopirox against dermatophytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 9, p. 1216-1227, 2018.

DE SOUZA, E. W.; BORBA, C. D. M.; PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; LANGOHR, I. M.; OLIVEIRA, M. M. E; OLIVEIRA, R. D. V. C.; DA CUNHA, C. R. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MIRANDA, L. H. M.; MENEZES, R. C. Clinical features, fundal load, coinfections, histological skin changes and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

DELLA TERRA, P. P.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. (2017). Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. (8), p.e0005903, 2017.

DUARTE, J. M. G.; ACOSTA, V. R. W.; VIERA, P. M. L. F.; CABALLERO, A. A.; MATIAUDA, G. A. G.; ODDONE, V. B. R.; BRUNELLI, J. G. P. Sporotrichosis transmitted by domestic cat. A family case report. **Revista del Nacional**, v. 9, n. 2, p. 67-76, 2017

ESPINEL-INGROFF, A.; et al. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. 10-1128, 2017.

ETCHECOPAZ, A.N., LANZA, N.; TOSCANINI, M. A., et al. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. **J Mycol Med.** Published online 2019:100908. doi:10.1016/j.mycmed.2019.100908

ETCHECOPAZ, A. N. et al. Molecular epidemiology of *Sporothrix brasiliensis* in cats in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 4, p. 107, 2019.

ETCHECOPAZ, A. N.; LANZA, N.; TOSCANINI, M. A.; DEVOTO, T. B.; POLA, S. J.; DANERI, G. L.; IOVANNITI, C. A.; CUESTAS, M.L. Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, p.100908, 2020.

FERNANDES, K. S. S.; COELHO, A. L. J.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. **Immunology**, v. 101, n. 4, p. 563–569, 2000.

FORLANI, G. S.; BRITO, R. S. A. D.; SALAME, J. P.; GOMES, A. D. R.; NOBRE, M. O. Esporotricose em um felino soropositivo para FeLV: relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, v.23, n. 137, p.58-68, 2018.

FORLANI, G. S.; BRITO, R. S. A. D.; SALAME, J. P; GOMES, A. D. R.; BRUHN, F. R. P.; MADRID, I. M.; NOBRE, M. D. O. Thymomodulin in association with antifungal drugs in the therapy of cats with disseminated cutaneous sporotrichosis: a prospective study. **Ciência Rural**, v. 51, n. 6, 2021.

GARCIA, N. G. et al. First isolation of *Sporothrix brasiliensis* from a cat with sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 3, p. 157–158, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.01.005>.

GOMES, R. R. et al. Molecular epidemiology of *Sporothrix brasiliensis* reveals geographical structure and association with feline outbreaks in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 121, 2016.

GREMIÃO, I.D.F.; DA ROCHA, E.M.S.; MONTENEGRO, H.; CARNEIRO, A.J.B.; XAVIER, M.O; DE FARIAS, M.R.; MONTI, F.; MANSHO, W.; PEREIRA, R. H. M. A.; PEREIRA, S. A.; LOPES-BEZERRA, L.M. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian journal of Microbiology**, v.52, p. 107-124, 2021.

GREMIÃO, I. D. F.; MENEZES, R. C.; SCHUBACH, T. M. P.; FIGUEIREDO, A. B. F.; CAVALCANTI, M. C. H; PEREIRA, S. A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2015.

GREMIÃO, I. D. F.; OLIVEIRA, M. M. E.; de MIRANDA, L. H. M.; FREITAS, D. F. S.; PEREIRA, S. A. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p.621–624, 2020.

GREMIÃO, I.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; HONSE, C. D. O.; BARROS, M. B. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 9, p.346-351, 2011.

GREMIAO, I.D.F.; MIRANDA, L.H.M.; REIS, E.G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.

GUTERRES, K. A.; de MATOS, C. B.; OSÓRIO, L. D. G.; SCHUCH, I. D.; CLEFF, M. B. The Use of (1–3)  $\beta$ -Glucan Along with Itraconazole Against Canine Refractory Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3–4, p.217–221, 2014.

HIRUMA, M.; YAMAJI, K.; SHIMIZU, T.; OHATA, H.; KUKITA, A. Ultrastructural study of tissue reaction of mice against *Sporothrix schenckii* infection. **Archives of dermatological research**, v. 280, p.S94-100, 1988.

HU, Z.; Z. YUJIAO; CHEN, J.; CHEN, J.; LI, C; GAO, Z.; LI, J.; LIU, L. Sesquiterpenoids with phytotoxic and antifungal activities from a pathogenic fungus *Aspergillus alabamensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 38, p. 12065-12073, 2022.

JAHAM, C.; PARADIS, M.; PAPICH, M.G. Antifungal dermatologic agents: azoles and allylamines. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 22, n. 6, p.548-559, 2000.

KAADAN, M. I.; DENNIS, M.; DESAI, N.; YADAVALLI, G.; LEDERER, P. One health education for future physicians: a case report of cat transmitted sporotrichosis. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, p. ofaa049, 2020.

KAJIWARA, H.; SAIATO, M.; OHGA, S.; UNEOTSUCHI, T.; YOSHIDA, S. I. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p.5073-5079, 2004.

KINNISON, T.; GUILE, D.; MAY, S.A. Errors in veterinary practice: preliminary lessons for building better veterinary teams. **Veterinary Record**, v. 177, n. 19, p.492-492, 2015.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 4, p.314–319, 2007.

KOTHARI, S. K.; JAIN, A. K.; MEHTA, S. C.; TONPAY, S. D. Antibacterial and antifungal activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* Linn.). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 9, n. 1, p. 159–161, 2011.

KUMAR, G. P.; YADAV, S. K.; PANDEY, A. K. Phytochemical screening and antimicrobial activity of wheatgrass extract on bacterial and fungal pathogens. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1085–1090, 2013.

LIMA, M. L. et al. Antimicrobial and antioxidant potential of annatto seed extract. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 78, 2020.

LITTLE, S.; LEVY, J.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R. ; HOSIE, M.; OLAH, G.; DENIS, K. S. 2020 AAFP feline retrovirus testing and management guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 1, p. 5-30, 2020.

LLORET, A.; HARTMANN, K.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD- JONES, T.; HOSIE, M. J.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p.619-623, 2013.

MACÊDO-SALES, P. A. D.; SOUTO, S. R. L. D. S.; DESTEFANI, C. A.; LUCENA, R. P. D.; ROCHA, E. M. D. S. D.; BAPTISTA, A. R. D. S. Laboratory diagnosis of feline sporotrichosis in samples from Rio de Janeiro State, Brazil: imprint cytopathology limitations / Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. **Rev Pan-Amaz Saúde**, p. 13–19, 2018.

MACÊDO-SALES, P. A.; SOUTO, S. R. L. S.; DESTEFANI, C. A.; LUCENA, R. P.; MACHADO, R. L. D.; PINTO, M. R.; RODRIGUES, A. M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ROCHA, E. M. S.; BAPTISTA, A. R. Domestic feline contribution in the transmission of Sporothrix in Rio de Janeiro State, Brazil: A comparison between infected and non-infected populations. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 19, p. 1–10, 2018.

MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p.265–273, 2012.

MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; MARTINS, A.; NOBRE, M. D. O.; MEIRELES, M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 2, p.151-154, 2010.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J. SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. Sporothrix brasiliensis, S. globosa, and S.mexicana, three new Sporothrix species of clinica interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3198-3206, 2007.

MASTROIANNI, A. R.; CELLENO, L.; BORGIA, M. G.; CERIMELE, D. L'estratto acquoso di "Triticum vulgare": valutazione clinic-istologica Nei processi riparativi tissutali cutanei. **Giornale Italiano di dermatologia e venereologia**, v. 133, n. 2, p. 145-153, 1998.

MIRANDA, L. H. M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; QUINTELLA, L. P.; KURAIEM, B. P.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative**

**Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p.425-432, 2013.

MIRANDA, L. H. M.; MELI, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; NOVACCO, M.; MENEZES, R. C.; PEREIRA, S. A.; SUGIARTO, S.; REIS, E. G.; GREMIÃO, I. D. F.; HOFMANN-LEHMANN, R. H. Co-infection with feline retrovirus is related to changes in immunological parameters of cats with sporotrichosis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p.e0207644, 2018a.

MIRANDA, L. H. M.; SANTIAGO, M. D. A.; SCHUBACH, T. M.; MORGADO, F. N.; PEREIRA, S. A.; OLIVEIRA, R. D. V. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8low cells and a decrease in CD4+ cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p.29–39, 2016.

MIRANDA, L. H. M.; SILVA, J.N.; GREMIÃO, I.D.F.; MENEZES, R.C.; ALMEIDA-PAES, R.; REIS, E.G.; OLIVEIRA, R.V.C.; DE ARAUJO, D.S.A.; FERREIRO, L.; PEREIRA, S.A. Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin lesions of cats for predicting antifungal treatment. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p.1–11, 2018b.

MUNHOZ, L. S.; POESTER, V. R.; BENELLI, J. L.; MELO, A. M.; TRÁPAGA, M. R.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; FLORES, M.M.; STEVENS, D. A.; XAVIER, M.O. Effectiveness of diphenyl diselenide against experimental sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 61. , n. 4, p. myad035, 2023.

NAKASU, C. C. T.; WALLER, S. B.; RIPOLL, M. K.; FERREIRA, M. R. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; GOMES, A. R.; OSÓRIO, L. D. G.; FARIA, R. O.; CLEFF, M.B. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p.163-171, 2021.

NASCIMENTO, S. C.; OLIVEIRA, J. A.; MOTA, M. L. Avaliação da atividade antifúngica de extratos oleosos de *Bixa orellana* sobre fungos dermatofíticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 413–418, 2007.

NOBRE, M. D. O.; CASTRO, A. P. D.; CAETANO, D.; SOUZA, L. L.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO, L. (2001). Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de micologia**, v.18, p.137-140, 2001.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. D. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p.175-184, 2002.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* complex species to antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4805–4807, 2011.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*, v. 172, n. 4, p. 257-267, 2011.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex species: literature review and clinical aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 117, p. e210518, 2022

OLIVEIRA, M. M. E.; MAIFREDE, S. B.; RIBEIRO, M. A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 7, p.936-938, 2013.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M.; LAZERA, M.; REIS, R. S.; CHICARINO-COELHO, J. M. Zoonotic sporothricosis transmitted by cats in Rio de Janeiro, Brazil. A case report. *Dermatology online journal*, v. 8, n. 2, p.5-5, 2002.

PAES, R.A.; OLIVEIRA, L.C.; OLIVEIRA, M.M.E; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

PENG-CHENG, L.; YOSHIIKE, T.; YAGUCHI, H.; OGAWA, H. Histopathological studies of *Sporothrix schenckii*-inoculated mice. *Mycopathologia*, v. 122, n. 2, p.89-93, 1993.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; BOECHAT, J. S.; VIANA, P. G.; SCHUBACH, T. M. P. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 3, p.392-393, 2014.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; MENEZES, R. C. Sporotrichosis in animals: zoonotic transmission. In: Sporotrichosis. Springer, Cham, 2015. p.83-102.

PEREIRA, S. A.; PASSOS, S. R. L.; SILVA, J. N.; GREMIÃO, I. D. F.; FIGUEIREDO, F. B.; TEIXEIRA, J. L.; MONTEIRO, P. C. F.; SCHUBACH, T. M. P. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Veterinary Record*, v. 166, n. 10, p.290-294, 2010.

POESTER, V. R.; BASSO, R. P.; STEVENS, D. A; MUNHOZ, L. S.; RABELLO, V. B. D. S.; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; ZANCHI, M.; BENELLI, J. L.; XAVIER, M. O. Treatment of human sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 1, p. 70, 2022.

POESTER, V. R.; MATTEI, A. S.; MADRID, I. M.; PEREIRA, J. T. B.; KLAFKE, G. B.;

SANCHOTENE, K. O.; BRANDOLT, T. M.; XAVIER, M. O. Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 7, p.815-821, 2018.

POMA-CASTILLO, L.; ESPINOZA-POMA, M. Antifungal activity of ethanol-extracted Bixa orellana L (Achiote) on *Candida albicans*, at six different concentrations. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 20, n. 10, p. 1159-1163, 2018.

QUEIROZ-TELLES, F.; FAHAL, A. H.; FALCI, D. R.; CACERES, D. H.; CHILLER, T.; PASQUALOTTO, A. C. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367-e377, 2017.

RAHMAN, M. A. et al. Phytochemicals as alternative antifungal agents in the treatment of *Candida* infections – A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, p. 104879, 2021.

RACHMAN, R.; LIGAJ, M.; CHINTHAPALLI, S.; WANI, R. S.; Zoonotic acquisition of cutaneous *Sporothrix brasiliensis* infection in the UK. **BMJ Case Reports** CP, v. 156, n.5, p. e248418, 2022.

REIS, É. G.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; SILVA, J. N.; CARVALHO, B. W.; QUINTANA, M. S.; GREMIÃO, I. D. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. **Medical mycology**, v. 54, n. 7, p.684-690, 2016.

RIBEIRO, R. T. S. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous and ethanolic plant extracts. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 137–144, 2018.

RODRIGUES, A. M. et al. *Sporotrichosis* caused by *Sporothrix brasiliensis*: epidemiology, clinical manifestations, and treatment. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003552, 2014.

RODRIGUES, A. M.; GONÇALVES, S. S.; CARVALHO, J. A.; BORBA-SANTOS, L. P.; ROZENTAL, S.; DE CAMARGO, Z. P. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. **Journal of Fungi**, v.8, n. 8, p. 776, 2022.

RODRIGUES, A. M.; BAGAGLI, E.; DE CAMARGO, Z. P.; BOSCO. S. D. M. G. *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in na armadillo's burrow. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3-4, p.199-206, 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 12, p.e0004190, 2015.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, p.e1005638, 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; PIRES, D. C.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L.; DE CAMARGO, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p.1-9, 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z. P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging microbes & infections**, v. 3, n. 1, p.1-10, 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p.405-412, 2013.

RODRIGUES, A. M.; DELLA TERRA, P. P.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; OROFINO-COSTA, R.; DE CAMARGO, Z. P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, p.1-30, 2020.

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; LOPES-BEZERRA, L. M.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p.e2281, 2013.

ROSSOW, J. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; CACERES, D. H.; BEER, K. D.; JACKSON, B. R.; PEREIRA, J. G.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A. A one health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis* narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 247, 2020.

SANCHOTENE, K.O.; MADRID, I. M.; KLAFKE, G. B.; BERGAMASHI, M.; TERRA, P. P. D.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652-658, 2015.

SANCHOTENE, K. O.; BRANDOLT, T. M.; KLAFKE, G. B.; POESTER, V. R.; XAVIER, M. O. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: Comparison of yeast and mycelial phases. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p.869-876, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myw143>.

SANTOS, J. A. A.; SOUSA, M. F. A. M.; SILVA, E. L. V.; AGUIAR JÚNIOR, F. C. A. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 637-643, 2014.

SILVA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; LIMA, E. O. Estudo da atividade antimicrobiana do extrato oleoso de *Bixa orellana* L. frente a microrganismos de

interesse médico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 554–559, 2008.

SILVA, G. M.; HOWES, J. C. F.; LEAL, C. A. S.; MESQUITA, E. P.; PEDROSA, C.M.; OLIVEIRA, A. A. F.; SILVA, L. B. G.; MOTA, R. A. Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 9, p. 1767-1771, 2018.

SILVA, J. N. et al. *In vitro* resistance of *Sporothrix brasiliensis* to itraconazole associated with therapeutic failure in sporotrichosis. *Medical Mycology*, v. 58, n. 3, p. 356–360, 2020.

SILVA, J. N. et al. Resistance of *Sporothrix brasiliensis* to antifungal drugs: an emerging concern. *Medical Mycology*, v. 59, n. 3, p. 234–242, 2021.

SILVA, M. B. T.; COSTA, M. M. D. M.; TORRES, C. C. S.; GALHARDO, M. C. G.; VALLE, A. C. F. D.; MAGALHÃES, M. D. A. F.; SABROZA, P. C.; OLIVEIRA, R. M. D. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 28, p. 1867-1880, 2012.

SINGH, N.; VERMA, A.; MISHRA, A. Wheatgrass: an alternative therapeutic approach for fungal infections. *Journal of Pharmacy Research*, v. 9, n. 5, p. 321–324, 2015.

SIVÉN, M.; SAVOLAINEN, S.; RÄNTILÄ, S.; MÄNNIKKÖ, S.; VAINIONPÄÄ, M.; AIRAKSINEN, S.; RAEKALLIO, M.; VAINIO, O.; JUPPO, A. M. Difficulties in administration of oral medication formulations to pet cats: an e-survey of cat owners. *Veterinary Record*, v. 180, n. 10; p. 250-250, 2017. <https://doi.org/10.1136/vr.103991>

SOLÓRZANO, Ó. T.; REYNA, H. H.; VELÁZQUEZ, J. L. L.; AGUILAR, J. P.; VALENCIA, M. G. Evaluación de la actividad reepitelizante del *Triticum vulgare* em la cervicitis crônica erosiva. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, v. 44, n. 1, p. 8-11, 2001.

SOUZA, D. L. et al. Antifungal activity of natural products against *Candida* and *Aspergillus* species: a systematic review. *Mycoses*, v. 63, n. 3, p. 261–272, 2020.

SOUZA, D. W.; MACHADO, T. S. D. L.; ZOPPA, A. L. D. V. D.; CRUZ, R. S. F.; GÁRAGUE, A. P.; SILVA, L. C. L. C. Ensaio da aplicação de crème à base de *Triticum vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Revista Brasileira Plantas Medicinais*, v. 8, n. 3, p. 9-13, 2006.

SOUZA, L. L. D.; NASCENTE, P. D. S.; NOBRE, M. O.; MEINERZ, A. R. M.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 372-374, 2006.

SOUZA, L. L.; NOBRE, M. D. O.; SILVEIRA, M.; REICHAK, D.; NASCENTE, P.; MEIRELES, M. C. A. Esporotricose em gatos portadores do vírus da leucemia felina. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 12, n 13, p. 99-101, 2005.

STOPIGLIA, C. D. O. MAGAGNIN, C. M.; CASTRILLÓN, M. R.; MENDES, S. D. C.; HEIDRICH, D.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M.L. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 56–64, 2014.

THOMPSON, G. R.; LE, T.; CHINDAMPORN, A.; KAUFFMAN, C. A.; ALAUSTRUEY-IZQUIERDO, A.; AMPEL, N. M.; PASQUALOTTO, A. C. Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. e364-e374, 2021.

THOMSON, P.; GONZÁLEZ, C.; BLANK, O.; RAMÍREZ, V.; RÍO, C. D.; SANTIBÁÑEZ, S.; PENA, P. Sporotrichosis outbreak due to *Sporothrix brasiliensis* in domestic cats in Magallanes, Chile: a one: health approach study. **Journal of Fungi**, v.9, n. 2, p. 226, 2023.

TILLMANN, M. T.; MENDES, C. B. M.; FISCHER, G.; JÚNIOR VARELA, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O. Triticum aestivum in open skin wounds: cytotoxicity and collagen histopathology, v. 39, n.4, p. 1547-1554, 2018.

TILLMANN, M.T.; FELIX, A. O. C.; MUELLER, E.N.; FELIX, S.R.; ALVES, G. H.; RAMOS, T. S.; NOBRE, M. O. Uso de Triticum aestivum na cicatrização de feridas: um ensaio clínico, histopatológico e tensiométrico em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1757-1761, 2014.

WALLER, S. B.; LANA, D. F. D.; QUATRIN, P. M.; FERREIRA, M. R. A.; FUENTEFRIA, A. M.; MEZZARI, A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 73-80, 2021.

WALLER, S. B.; RIPOLL, M. K.; MADRID, I. M.; ACUNHA, T.; CLEFF, M. B.; CHAVES, F. C.; DE MELLO, J. R. B.; DE FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. Susceptibility and resistance of *Sporothrix brasiliensis* to branded and compounded itraconazole formulations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 155-162, 2020.

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat, **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 249-259, 2017.

XAVIER, M. O.; POESTER, V. R.; TRÁPAGA, M. R.; STEVENS, D. A.. *Sporothrix brasiliensis*: epidemiology, therapy, and recent developments, **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p 921, 2023.

ZAINÉ, L.; MONTI, M.; VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A. C. Immunomodulatory nutraceutical with potential clinical use for dogs and cats. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4Supl, p. 2513-2530, 2014

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A. M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L.; CHEN, M.; DENG, S.; LI, S; LIAO, W.; LI, R.; LI, F.;

MEIS, J. F.; GUARRO, J.; TEIXEIRA, M.; AL-ZAHRANI, H. S.; DE CAMARGO, Z.P.; ZHANG, L.; DE HOOG, G. S. (2015). Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v.35, p.1, 2015.

## **Anexos**

## Anexo A - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

### Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação de formulações associadas a imunomodulação no tratamento de esporotricose experimental”** processo número 23110.025990/2018-84, de responsabilidade de **Márcia de Oliveira Nobre** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 13/08/2018.

Finalidade	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa	<input type="checkbox"/> Ensino
Vigência da autorização	01/10/2018 a 01/02/2020	
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar	
Nº de animais	240	
Idade	60 dias	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central – UFPel	

Código para cadastro **CEEA 25990-2018**

---

**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**

Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVERA CAMPELLO FELIX**, Médico Veterinário, em 15/08/2018, às 10:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---

## Anexo B - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

A autenticidade deste documento pode ser conferida no

site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0242417** e o código CRC **6C8F906F**.



PARECER Nº  
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
133/2018/CEEA/REITORIA  
23110.030742/2018-55

### Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação de formulação tópica em felinos acometidos por esporotricose” processo número 23110.030742/2018-55, de responsabilidade de Márcia de Oliveira Nobre - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/12/2018.

Finalidade	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa <input type="checkbox"/> Ensino
Vigência da autorização	15/12/2018 a 01/02/2020
Espécie/linhagem/raça	Felino/SRD
Nº de animais	40
Idade	1-8 anos

Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Atendimentos de rotina clínica do Hospital de Clínicas Veterinária (HCV) da UFPEL, do Centro de Controle de Zoonoses da prefeitura municipal de Pelotas e de clínicas veterinárias particulares do município de Pelotas (RS) e região

Código para cadastro CEEA 30742/2018

---

M.V. Dra. Anelize de  
Oliveira Campello  
Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário, em 14/12/2018, às 14:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0390556 e o código CRC 4AA776EB.

---